

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 4 月 11 日 (11.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/29090 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12Q 1/02, 1/48, C12N 15/09, C07K 16/18, 14/47, A61K 39/395, A61P 43/00, 35/00, 9/00, A61K 45/00, G01N 33/15, 33/50
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 澁谷正史 (SHIBUYA, Masabumi [JP/JP]; 〒333-0866 埼玉県川口市芝5374-18-601 Saitama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/08684
- (72) 発明者: 高橋知子 (TAKAHASHI, Tomoko); 〒275-0021 千葉県習志野市袖ヶ浦6-5-10 Chiba (JP). 古谷安希子 (FURUYA, Akiko). 設楽研也 (SHITARA, Kenya); 〒194-0023 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2001 年 10 月 2 日 (02.10.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (74) 代理人: 弁理士 小栗昌平, 外(OGURI, Shohei et al.); 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).
- (30) 優先権データ:  
特願2000-303694 2000 年 10 月 3 日 (03.10.2000) JP
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
- (71) 出願人: 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: SUBSTANCE INHIBITING THE BINDING OF SIGNAL TRANSDUCING MOLECULE TO KDR/FLK-1 PHOSPHORYLATED AT TYROSINE AT THE 1175-POSITION AND METHOD OF USING THE SAME

(54) 発明の名称: 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質およびその利用方法

(57) Abstract: A substance blocking the intracellular signal transduction of KDR/Flk-1 and inhibits cell proliferation by VEGF; a method of inhibiting the signal transduction of KDR/Flk-1 by using this substance; a method of inhibiting cell proliferation by using the same; a method of inhibiting angiogenesis by using the same; a method of screening a cell proliferation inhibitor by using the same; a method of screening an angiogenesis inhibitor by using the same; a method of screening a substance inhibiting the signal transduction of KDR/Flk-1 by using the same; a method of judging whether or not a test substance inhibits the signal transduction of KDR/Flk-1 by using the same; and a method of screening a substance inhibiting the phosphorylation at tyrosine at the 1175-position of KDR/Flk-1 by using the same.

(57) 要約:

本発明は、KDR/Flk-1 の細胞内情報伝達を遮断し、VEGF による細胞増殖を阻害する物質が提供する。さらに、本発明は、該物質を用いた KDR/Flk-1 の情報伝達を阻害する方法、細胞増殖を阻害する方法、血管新生を阻害する方法、細胞増殖阻害剤のスクリーニング法、血管新生阻害剤のスクリーニング法、KDR/Flk-1 の情報伝達を阻害する物質のスクリーニング法、被験物質が KDR/Flk-1 の情報伝達を阻害するか否かを判定する方法、組織での血管新生を検出する方法、および KDR/Flk-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法を提供する。

WO 02/29090 A1



LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された  
生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

### 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 に対する 情報伝達分子の結合を阻害する物質およびその利用方法

#### 技術分野

本発明は 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質に関する。さらに、本発明は、該物質を用いた KDR/Flk-1 の情報伝達を阻害する方法、細胞増殖を阻害する方法、血管新生を阻害する方法、細胞増殖阻害剤のスクリーニング法、血管新生阻害剤のスクリーニング法、KDR/Flk-1 の情報伝達を阻害する物質のスクリーニング法、被験物質が KDR/Flk-1 の情報伝達を阻害するか否かを判定する方法、組織での血管新生を検出する方法、および KDR/Flk-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法に関する。

#### 背景技術

血管新生は、脊椎動物の個体の発生および組織の構築に重要な役割を果たすとともに、成熟個体（雌）の性周期における黄体形成、子宮内膜の一過性の増殖および胎盤形成などにも密接に関与している。さらに、病的状態としては、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、糖尿病性網膜症および慢性関節リュウマチの病態形成あるいは促進に血管新生が深く関与している [J. Biol. Chem., 267, 10931 (1992)]。血管新生は、血管新生因子の分泌が引き金となり、分泌された血管新生因子の近傍にある既存の血管の内皮細胞からのプロテアーゼ分泌による基底膜、間質の破壊、続いて起こる血管内皮細胞の遊走、増殖により、管腔が形成され、血管が新生される過程よりなる [J. Biol. Chem., 267, 10931 (1992)]。血管新生を誘導する因子としては、vascular permeability factor（以下、VPF と略記する）、vascular endothelial growth factor（以下、VEGF と略記する）があり

(以下、VPF/VEGF と記す)、これらは発生過程における血管新生および病的な状態における血管新生において最も重要な因子として知られている [Advances in Cancer Research, 67, 281 (1995)]。VPF/VEGF はホモダイマーよりなる分子量約 4 万の蛋白質であり、1983 年に血管透過性促進因子 (Vascular permeability factor: VPF) として [Science, 219, 983 (1983)]、1989 年に血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) として [Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)] 報告されたが、cDNA クローニングの結果、両者は同一の物質であることが明らかとなった [Science, 246, 1306 (1989); Science, 246, 1309 (1989)] (以下、VPF/VEGF は VEGF と記す)。VEGF の活性としてはこれまでに、血管内皮細胞に対する、増殖促進活性 [Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)]、遊走促進活性 [J. Immunology, 152, 4149 (1994)]、マトロプロテアーゼ分泌促進活性 [J. Cell. Physiol., 153, 557 (1992)]、ウロキナーゼ、tPA 分泌促進活性 [Biochem. Biophys. Res. Comm., 181, 902 (1991)] などが知られており、イン・ビボ (in vivo) において血管新生促進活性 [Circulation, 92, suppl II, 365 (1995)]、血管透過性促進活性 [Science, 219, 983 (1983)] などがこれまでに知られている。VEGF は血管内皮細胞に極めて特異性の高い増殖因子であり [Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)]、また mRNA のオルタナティブ・スプライシング (Alternative splicing) により分子量の異なる 4 種類の蛋白質が存在することが報告されている [J. Biol. Chem., 67, 26031 (1991)]。

血管新生を伴う疾患の中で、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成に VEGF が深く関与していることが報告されている。固形腫瘍については、これまでに腎癌 [Cancer Research, 54, 4233 (1994)]、乳癌 [Human Pathology, 26, 86 (1995)]、脳腫瘍 [J. Clinical Investigation, 91, 153 (1993)]、消化器癌 [Cancer Research, 53, 4727 (1993)]、卵巣癌 [Cancer Research, 54, 276 (1994)] などの多くのヒト腫瘍組織における VEGF の産生が報告されている。また、乳癌患者の腫瘍における VEGF

発現量と患者の生存率との相関性を検討した結果、VEGF 高発現腫瘍は、VEGF 低発現腫瘍に比べて腫瘍血管新生が盛んであり、かつ VEGF 高発現腫瘍の乳癌患者は、VEGF 低発現腫瘍の乳癌患者に比べて生存率が低いことも明らかとなっている [Japanese J. Cancer Research, 85, 1045 (1994)]。また、ヌードマウスにヒト腫瘍を皮下移植したゼノグラフトモデル実験系において、抗 VEGF モノクローナル抗体は腫瘍増殖抑制効果を示すことが報告されている [Nature, 362, 841 (1993)]。さらに、ヌードマウスにおけるヒト腫瘍の転移癌モデルにおいて、抗 VEGF モノクローナル抗体は癌転移を抑制できることが報告されている [Cancer Research, 56, 921 (1996)]。また、ヒトの癌性胸水、腹水中に高濃度の VEGF が検出されることから、胸水、腹水貯留の主要な因子である可能性も示されている [Biochimica et Biophysica Acta, 1221, 211 (1994)]。

糖尿病網膜症においては、血管新生の異常により網膜剥離や硝子体出血をおこして失明にいたるが、糖尿病性網膜症における血管新生と患者眼球内の VEGF レベルが正相関することが報告されている [New England J. Medicine, 331, 1480 (1994)]。また、サルの網膜症モデルにおいて抗 VEGF 中和モノクローナル抗体の眼内投与により VEGF 活性を抑制すると血管新生が抑制されることが報告されている [Arch Ophthalmol., 114, 66 (1996)]。

慢性関節リュウマチの関節炎の病態の進展（骨、軟骨の破壊）には血管新生を伴うが、慢性関節リュウマチ患者の関節液中には VEGF が高濃度で含まれていること、関節中のマクロファージが VEGF を産生することが報告されている [Journal of Immunology, 152, 4149 (1994); J. Experimental Medicine, 180, 341 (1994)]。

VEGF の受容体として、Flt-1 (fms-like tyrosine kinase) [Shibuya M et al., Oncogene, 5, 519 (1990)、 de Vries C et al., Science, 255, 989 (1992)] および KDR (kinase insert domain-containing receptor) [W092/14748、Terman BI et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 187, 1579 (1992)] が報告されている。KDR はマウスでは Flk-1 (fetal liver kinase-1) として発見された [W.

Matthews et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9026 (1991)、W094/11499、Millauer B. et al., Cell, 72, 835 (1993)] ので、ここでは KDR/Flk-1 と総称する。

Flt-1 および KDR/Flk-1 は両者とも、細胞外ドメインは 7 個のイムノグロブリン様ドメインからなり、細胞内ドメインにはチロシンキナーゼドメインを有する、分子量 180~200kDa の受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する膜蛋白である。VEGF は Flt-1 および KDR/Flk-1 にはそれぞれ  $K_D$  値が 20pmol/l および 75pmol/l で特異的に結合する。Flt-1 および KDR/Flk-1 は血管内皮細胞に特異的に発現していると報告されている [Quinn TP et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7533 (1993)、Kendall RL et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8915 (1993)]。

ヒト脳腫瘍組織の腫瘍血管内皮細胞 [Hatva E et al., Am. J. Pathol., 146, 368 (1995)]、ヒト消化器癌組織の腫瘍血管内皮細胞 [Brown LF et al., Cancer Res., 53, 4727 (1993)] において、正常組織の血管内皮細胞に比べ KDR/Flk-1 の mRNA レベルの発現が上昇していることが報告されている。これらの結果は、腫瘍血管新生において VEGF-KDR/Flk-1 系が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。さらに、慢性関節リウマチ患者の関節の血管内皮細胞においてもイン・サイチュ (in situ) ハイブリダイゼーションにより KDR/Flk-1 の mRNA の発現が認められることが報告されており [Fava RA et al., J. Exp. Med., 180, 341, (1994)]、慢性関節リウマチにおける VEGF-KDR/Flk-1 系の重要性を示唆している。

KDR/Flk-1 の機能については、ブタ動脈の血管内皮細胞に KDR/Flk-1 を発現させると VEGF に反応し増殖、遊走することから、VEGF の多様な活性の中で KDR/Flk-1 は血管内皮細胞の増殖、遊走に関与すると報告されている [Waltenberger J et al., J. Biol. Chem., 269, 26988 (1994)]。また、KDR/Flk-1 遺伝子を破壊したノックアウトマウスでは血管内皮細胞の増殖や血管の形成が全く認められず、卵黄囊の血島も形成されず、発生後 8.5 から 9.5 日の

胎児期に死亡したことから、動物個体においても KDR/Flk-1 は血管内皮細胞の増殖、分化に関与することが報告されている [Shalaby F et al., *Nature*, 376, 62 (1995)]。

一方、Flt-1 遺伝子のノックアウトマウスも同じ胎児期に死亡するが、その原因は内皮細胞の過剰な増殖と正常な血管の構造が形成できないためであることから [Fong G-H et al., *Nature*, 376, 66 (1995)]、Flt-1 は内皮細胞の増殖を抑制するネガティブな調節因子として血管内皮の正常な構造形成に関与していると考えられ、KDR/Flk-1 と Flt-1 は VEGF がその作用を示すうえでそれぞれ別の役割を果たしていると考えられる。

VEGF と KDR/Flk-1 との結合を阻害できるような KDR/Flk-1 の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体が、in vitro で血管内皮細胞における KDR/Flk-1 の情報伝達を阻害し増殖を阻害すること [Rockwell P et al., *Mol. Cell. Differ.*, 3, 91 (1995)]、およびこの抗体が、マウスに移植した種々の癌細胞の血管新生や増殖、転移を抑制することが報告されている [Prewett M et al., *Cancer Res.*, 59, 5209 (1999)]。また、KDR/Flk-1 のチロシンキナーゼに特異的な阻害剤 S U 5416 が、マウスに移植した種々の癌細胞の血管新生や増殖、あるいは転移を抑制することが報告されている [Annie T et al., *Cancer Res.*, 59, 99 (1999)、Shaheen RM et al., *Cancer Res.*, 59, 5412 (1999)]。

一般にチロシンキナーゼ型受容体の情報伝達は、リガンドとの結合により自己のチロシンキナーゼが活性化され、自己および他の分子のチロシン残基をリン酸化することで情報伝達が始まると考えられている。この場合、受容体の自己リン酸化チロシンに SH2 ドメインを介して別の蛋白質分子が結合し、この分子が他の分子と結合したり酵素反応をおこすことにより情報の伝達が行なわれていくと考えられている。KDR/Flk-1 の場合も、血管内皮細胞において、VEGF との結合により自己のチロシン残基がリン酸化を受けることが報告されている [J. Waltenberger et al., *J. Biol. Chem.*, 269, 26988 (1994)]。自己リン酸化されるチロシンの位置としては、これまで、大腸菌で発現させた KDR/Flk-1 の中の

951、996、1054、1059 位のチロシンが自己リン酸化されること [Dougher-Vermazen M et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205, 728 (1994)]、酵母を用いた系では、ホスホリパーゼ C- $\gamma$  (以下、PLC- $\gamma$  と略記する) が結合するコンセンサス配列に類似した配列中にある 801 位と 1175 位のチロシンがリン酸化を受けること [Cunningham SA et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240, 635 (1997)] が報告されている。動物細胞で発現させた KDR/Flk-1 の主な自己リン酸化部位は 1175 位、1214 位のチロシンであり、801 位チロシンはほとんど自己リン酸化を受けないことが報告されている (高橋ら、第 5 回 Vascular Medicine 学会 2000 年)。また、酵母ツーハイブリッドシステムにより、KDR/Flk-1 の 1175 位のチロシンにアダプター蛋白質 Sck がその SH2 ドメインを介して結合していることが見出されている [Igarashi K et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251, 72 (1998)]。

KDR/Flk-1 の血管内皮細胞の増殖に至る情報伝達では、他のチロシンキナーゼ型受容体と異なり Ras や PI3 キナーゼの関与はほとんどなく、VEGF の刺激により活性化し自己リン酸化した KDR/Flk-1 に、PLC- $\gamma$  が結合してリン酸化を受けて活性化し、さらに PKC が活性化されその結果 MAP キナーゼの活性化と DNA 合成の誘導がおこるといふ、PLC- $\gamma$ -PKC-MAP キナーゼの系が主に関与していると考えられている [Takahashi T & Shibuya M, *Oncogene*, 14, 2079 (1997)、Takahashi T et al., *Oncogene*, 18, 2221 (1999)]。KDR/Flk-1 の 1175 位、1214 位のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体を内皮細胞由来の細胞株に発現させることにより、1175 位のチロシンのリン酸化が PLC- $\gamma$  のリン酸化や MAP キナーゼの活性化と関与することが報告されている (高橋ら、第 58 回日本癌学会総会 1999 年)。

また、内皮細胞内で VEGF 依存的に 1175 位チロシンがリン酸化されることが報告されている。さらに、リン酸化した 1175 位チロシンに対するポリクローナル抗体を作製し、この抗体が 1175 位のチロシンがリン酸化された KDR/Flk-1 を特異的に認識することも報告されている (高橋ら、第 5 回 Vascular Medicine 学会 2000



年)。しかし、このリン酸化した 1175 位チロシンに対する抗体と、細胞増殖の阻害との因果関係については知られていない。

### 発明の開示

ヒト型 VEGF 受容体 KDR の情報伝達を阻害できれば、ヒトにおける固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬等の異常な血管新生により病態が進行する疾患の治療に有用であることが期待される。

本発明の目的は、KDR/F1k-1 の細胞内情報伝達を遮断し、VEGF による細胞増殖を阻害する物質を取得し、さらに該物質の利用方法を提供することである。

KDR/F1k-1 の情報伝達に重要な自己リン酸化部位である、1175 位チロシンをリン酸化した KDR/F1k-1 に対する抗体を作製した。そして、この抗体が 1175 位チロシンがリン酸化された KDR/F1k-1 を特異的に検出できるのみならず、この抗体を内皮細胞に注入すると KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害し、VEGF に依存的な細胞の増殖を抑制できることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち本発明は以下に示す (1)～(38) に関する。

(1) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害する方法。

(2) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、細胞増殖を阻害する方法。

(3) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、血管新生を阻害する方法。

(4) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、細胞増殖阻害剤のスクリーニング法。

(5) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、血管新生阻害剤のスクリーニング法。

(6) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害する物質のスクリーニング法。

(7) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、被験物質が KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害するか否かを判定する方法。

(8) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、組織での血管新生を検出する方法。

(9) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法。

(10) 情報伝達分子がホスホリパーゼ C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) である、上記 (1)～(9) のいずれかに記載の方法。

(11) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質が、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 を特異的に認識する抗体である、上記 (1)～(9) のいずれかに記載の方法。

(12) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 を特異的に認識する抗体が、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に結合し、かつ PLC- $\gamma$  のリン酸化を阻害する抗体である、上記 (11) 記載の方法。

(13) 抗体がモノクローナル抗体またはその抗体断片である、上記 (11) または (12) 記載の方法。

(14) KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害する方法。

(15) KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、細胞増殖を阻害する方法。

(16) KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、血管新生を阻害する方法。

(17) KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、被験物質が KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害するか否かを判定する方法。

(18) KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、組織での血管新生を検出する方法。

(19) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を有効成分として含有する薬剤。

(20) 薬剤が、チロシンリン酸化阻害剤である上記 (19) に記載の薬剤。

(21) 薬剤が、細胞増殖阻害剤である上記 (19) に記載の薬剤。

(22) 薬剤が、血管新生阻害剤である上記 (19) に記載の薬剤。

(23) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質が、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 を特異的に認識する抗体である、上記 (19)～(22) のいずれかに記載の薬剤。

(24) 抗体が、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 を特異的に認識する抗体が、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に結合し、かつホスホリパーゼ C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) のリン酸化を阻害する抗体である、上記 (23) に記載の薬剤。

(25) 抗体がモノクローナル抗体またはその抗体断片である、上記 (23) または (24) に記載の薬剤。

(26) KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有する KDR/F1k-1 のチロシンリン酸化阻害剤。

(27) KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有する細胞増殖阻害剤。

(28) KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有する血管新生阻害剤。

(29) 上記 (4)～(6) および (9) のいずれかに記載の方法により得られる化合物。

(30) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 を認識するモノクローナル抗体またはその抗体断片。

(31) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に結合し、かつリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害するモノクローナル抗体またはその抗体断片である、上記 (30) 記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片。

(32) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に結合し、かつホスホリパーゼ C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) のリン酸化を阻害するモノクローナル抗体またはその抗体断片である、上記 (30) または (31) 記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片。

(33) ハイブリドーマ KM3035 (FERM BP-7729) が生産するモノクローナル抗体またはその抗体断片である、上記 (30)～(32) 記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片。

(34) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、1 本鎖抗体 (scFv)、2 量体化可変領域 (V 領域) 断片 (Diabody)、ジスルフィド安定化 V 領域断片 (dsFv) および相補性決定領域 (CDR) を含むペプチドから選ばれる抗体断片である上記 (30)～(33) のいずれか 1 項に記載の抗体断片。

(35) 上記 (30)～(34) のいずれか 1 項に記載されたモノクローナル抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合しているモノクローナル抗体またはその抗体断片。

(36) 上記 (30)～(35) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片をコードする DNA。

(37) 上記 (36) 記載の DNA を含む組換えベクター。

(38) 上記 (37) 記載の組換えベクターが宿主細胞に導入された形質転換体。

KDR/F1k-1 の細胞内情報伝達を遮断し、VEGF による細胞増殖を阻害する物質としては、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質、KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質があげられる。

1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質としては、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 を特異的に認識す

る抗体またはその抗体断片、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 と情報伝達分子との結合を阻害する化合物などがあげられる。

本発明の 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 を特異的に認識する抗体またはその抗体断片としては、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 を特異的に認識して結合し、1175 位チロシンがリン酸化を受けていない KDR/Flk-1 とは結合しない特異性を有する抗体（以下、「1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体」または「本発明の抗体」とも表記する）またはその抗体断片であれば、いずれでも用いられるが、好ましくはリン酸化された KDR/Flk-1 と PLC- $\gamma$  との結合を阻害する抗体またはその抗体断片があげられる。

本発明の抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体などがあげられるが、好ましくはモノクローナル抗体があげられる。

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産された抗体および、抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体をあげることができる。

遺伝子組換え抗体としては、ヒト化抗体、ヒト抗体および抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものが好ましく用いられる。

ヒト化抗体は、ヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体を包含する。

抗体断片は、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 に特異的に反応する抗体断片である Fab (Fragment of antigen binding の略)、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体 (single chain Fv; 以下、scFv と称す) (Science, 242, 423 (1988))、2 量体化可変領域 (V 領域とも称す) 断片 (以下、Diabody と表記する) (Nature Biotechnol., 15, 629 (1997))、およびジスルフィド安定化 V 領域断片 (disulfide stabilized Fv; 以下、dsFv と称す) (Molecular Immunol., 32, 249 (1995)) を包含する。

また、抗体断片には、上記抗体の抗体 V 領域重鎖（H 鎖とも称す）（以下、抗体可変領域重鎖を VH と称す）および抗体 V 領域軽鎖（L 鎖とも称す）（以下、抗体可変領域軽鎖を VL と称す）の相補性決定領域（complementary determining region; 以下、CDR と称す）のアミノ酸配列を含むペプチド（以下、CDR を含むペプチドと称す）（J. Biol. Chem., 271, 2966 (1996)）も包含する。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体可変領域重鎖および可変領域軽鎖とヒト抗体の定常領域重鎖（以下、CH と称す）およびヒト抗体の定常領域軽鎖（以下、CL と称す）とからなる抗体を意味する。

本発明のヒト型キメラ抗体は、1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

本発明のヒト型キメラ抗体の構造としては、いずれのイムノグロブリン（Ig）クラスに属するものでもよいが、IgG 型、さらには IgG 型に属する IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等のイムノグロブリンの C 領域が好ましい。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト抗体の VH および VL の CDR をヒト以外の動物の抗体の CDR 配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体は、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 に特異的に反応する、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR 配列で任意のヒト抗体の VH および VL の CDR 配列をそれぞれ置換した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH およびヒト抗体の CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体 C 領域の構造としては、いずれのイムノグロブリン (Ig) クラスに属するものでもよいが、IgG 型、さらに IgG 型に属する IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等のイムノグロブリンの C 領域が好ましい。

Fab は、IgG のヒンジ領域で 2 本の H 鎖を架橋している 2 つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パパイニンで分解して得られた、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体で構成された、分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EB ウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、scFv 等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2 本の完全な H 鎖および 2 本の完全な L 鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウス ES 細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該 ES 細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われ

ているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

本発明の Fab は、1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体をパパイン処理して得ることができる。または、該抗体の Fab 断片をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab を製造することができる。

Fab'は、上記  $F(ab')_2$  のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明の Fab'は、1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体の Fab'断片をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することができる。

$F(ab')_2$  は、IgG のヒンジ領域の 2 個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2 つの Fab 領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約 10 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明の  $F(ab')_2$  は、1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体をトリプシン処理して得ることができる。または、該抗体の  $F(ab')_2$  断片をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、 $F(ab')_2$  を製造することができる。

scFv は、一本の VH と一本の VL とを適当なペプチドリンカー（以下、P と称す）を用いて連結した、VH-P-VL ないしは VL-P-VH ポリペプチドを示す。本発明で使用する scFv に含まれる VH および VL は、本発明の 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体のいずれをも用いることができる。



本発明の scFv は、1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体を生産するハイブリドーマより VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv 発現ベクターを構築したのち該 cDNA を挿入し、大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ該発現ベクターを導入することにより発現させ製造することができる。

Diabody は、抗原結合特異性の同じまたは異なる scFv が 2 量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する 2 価の抗原結合活性または異なる抗原に対する 2 特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Diabody は、本発明の 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、3～10 残基のポリペプチドリンカーを有する scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより Diabody を発現させ、製造することができる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 [Protein Engineering, 7, 697 (1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明の dsFv に含まれる VH あるいは VL は 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体のいずれをも用いることができる。

本発明の dsFv は、1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体を生産するハイブリドーマより VH および VL をコードする cDNA を取得し、原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させることにより製造することができる。

CDR を含むペプチドは、VH または VL の CDR の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の CDR を含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることにより製造することができる。

本発明の CDR を含むペプチドは、本発明の 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体の VH および VL の CDR をコードする cDNA を構築し、該 cDNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、CDR を含むペプチドは、Fmoc 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc 法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明の 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体またはその抗体断片は、該抗体またはその抗体断片に放射性同位元素、蛋白質または薬剤などを化学的にあるいは遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

本発明の抗体の誘導体は、本発明の 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体の H 鎖或いは L 鎖の N 末端側或いは C 末端側、抗体または抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体または抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質あるいは薬剤などを化学的手法（抗体工学入門、金光修著、（株）地人書館（1994））により結合させることにより製造することができる。

または、本発明の 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体またはその抗体断片をコードする DNA と、結合させたい蛋白質をコードする DNA を連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入する。以上のような遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

放射性同位元素としては、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$  等があげられ、例えば、クロラミン T 法等により、抗体に結合させることができる。

薬剤としては、低分子のものが好ましく、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン C、ダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤等の抗癌剤（臨床腫瘍学、日本臨床腫瘍研究会編、癌

と化学療法社 (1996))、またはハイドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤 (炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社 (1982)) などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、ヒトインターロイキン 2 (hIL-2)、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (hGM-CSF)、ヒトマクロファージコロニー刺激因子 (以下、hM-CSF と表記する)、ヒトインターロイキン 12 (hIL-12) 等があげられる。また、癌細胞を直接障害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体については、抗体または抗体断片をコードする cDNA に蛋白質をコードする cDNA を連結させ、融合抗体をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 と情報伝達分子との結合を阻害する化合物としては、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対するアンチセンス RNA あるいは DNA、情報伝達分子に対する抗体またはその抗体断片、情報伝達分子に対するアンチセンス RNA または DNA、または後述するスクリーニング方法あるいはドラッグデザイン方法により得られた化合物などがあげられる。情報伝達分子としては、例えば PLC- $\gamma$  があげられる。

また、本発明の KDR/F1k-1 の 1175 位のチロシンのリン酸化を阻害する物質としては、KDR/F1k-1 の 1175 位のチロシンのリン酸化を阻害する抗体またはその

抗体断片、KDR/F1k-1 の 1175 位のチロシンのリン酸化を阻害する作用を有するキナーゼ阻害剤、または後述するスクリーニング方法あるいはドラッグデザイン方法により得られた化合物などがあげられる。

以下に、KDR/F1k-1 の 1175 位のチロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質、KDR/F1k-1 の 1175 位のチロシンのリン酸化を阻害する物質およびそれらの物質を含む医薬の用途について説明する。

# 1. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質および KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質の取得方法

## 1-1. 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体の製造法

### (1) 抗原とするペプチドの調製

1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体は、配列番号 7 に示した KDR/F1k-1 のアミノ酸配列のうちの、1175 位のチロシンを含む連続した 5～20 残基のアミノ酸配列からなり、1175 位チロシンに相当するアミノ酸がリン酸化チロシンになっているペプチドを化学合成し、このペプチドを抗原として動物を免疫することにより作製することができる。必要によってはペプチドの N 末端または C 末端には、後述する担体蛋白質との結合に用いるためのシステイン残基を付加した配列にする。このような抗原のペプチドとして、KDR/F1k-1 のアミノ酸配列の 1171～1180 番目の配列の N 末端にシステインを付加した配列を有し、1175 位のチロシン残基に相当する 4 番目のアミノ酸がリン酸化チロシンである配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドをあげることができる。チロシンがリン酸化されたペプチドは、文献の方法 [Kitas EA et al., *Helv. Chim. Acta*, 74, 1314 (1991)、Bannworth W and Kitas EA, *Helv. Chem. Acta*, 75, 707 (1992)、Kitas EA et al., *Tetrahedron Lett.*, 30, 6229 (1989)、Kitas EA et al., *Tetrahedron Lett.*, 29, 3591 (1988)] に基づきペプチド合成機等を用いて固相合成を行うことにより化学合成することができる。

## (2) 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR ポリクローナル抗体の調製

上記のペプチドに対するポリクローナル抗体を含む抗血清は、文献 [Harlow E and Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. (1988)] (以下、*Antibodies: A Laboratory Manual* と略記する) 等に記載の一般的な方法により、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバントとともに抗原を 10 日から 4 週間おきに数回投与して免疫を行うことにより調製することができる。抗原は (1) で調製したペプチドだけでは抗原として抗体を惹起する力が弱いので、ペプチドをキーホール・リンペット・ヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanine, KLH)、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、破傷風毒素などの担体蛋白質に結合させたものを抗原とし、例えばウサギでは 200~1000  $\mu$ g、マウスで 10~100  $\mu$ g を 1 回あたり投与する。ペプチドと担体蛋白質との結合は m-マレイニンイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミド (MBS)、グルタルアルデヒドを用いて行うことができる。アジュバントとしては、フロインドの完全アジュバント (Complete Freund's Adjuvant) または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどがあげられる。各投与後 3~10 日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、抗原に用いたリン酸化ペプチドに対する反応性について、酵素免疫測定法で確認し、その血清が十分な抗体価を示した動物から採取した血清を抗血清とする。酵素免疫測定法は、抗原に用いたリン酸化ペプチドをプレートにコートし、サンプルである血清を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射性同位体等で標識した抗イムノグロブリン抗体 (免疫に用いた動物のイムノグロブリンに対する抗体) を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、抗原ペプチドを認識し結合する抗体を検出および定量する方法である [酵素免疫測定法 (ELISA 法): 医学書院刊 (1976 年)]。

(1) で調製した抗原用のペプチドを、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド (N-hydroxysuccinimide, NHS) により活性化したセファロース-4B [アマシャム・フ

アルマシア・バイオテック (Amersham Pharmacia Biotech) 社製] やその充填済カラムであるハイトラップ NHS-活性化カラム (HiTrap NHS-activated column、アマシヤム・ファルマシア・バイオテック社製) 等に固定化して作製したアフィニティークラムを用いて、上記の抗血清に対してアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、容易に抗原ペプチドと結合するポリクローナル抗体を精製することができる。ペプチドの固定化やアフィニティークロマトグラフィーはメーカーのマニュアルに従って行うことができる。

このようにして精製したポリクローナル抗体中には、抗原としたペプチドの配列中のリン酸化チロシン以外の部分をエピトープとするために、抗原としたペプチドあるいは 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 と結合するばかりでなく、1175 位チロシンがリン酸化されていない KDR/F1k-1 ととも結合できるような抗体も含まれている。そこで、(1) で調製した抗原用のペプチドと同じアミノ酸配列において、リン酸化チロシンが (リン酸化されていない) チロシンになっているペプチドをペプチド合成機などで化学合成し、このペプチドを上記と同様にして固定化したアフィニティークラムに、上記で精製したポリクローナル抗体を通すことにより、1175 位チロシンがリン酸化を受けていない KDR/F1k-1 も認識する抗体 (このような抗体は、アフィニティークラム上の非リン酸化チロシンペプチドとも結合する) をカラムに結合させて除き、1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR ポリクローナル抗体を精製することができる。

### (3) モノクローナル抗体の調製

(2) と同様にして 3~20 週令のマウスまたはラットを免疫し、血清中に十分な抗体価を示した動物の脾臓、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。例えば脾臓を摘出し、脾細胞を採取する。

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c 由来) 骨髓腫細胞株 P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Kohler G et al., *Europ. J. Immunol.*, 6, 511 (1976)], SP2/0-Ag14(SP-2) [Shulmanet M et

al., Nature, 276, 269 (1978)], P3-X63Ag8653(653) [Kearney JF et al., J. Immunol., 123, 1548 (1979)], P3-X63Ag8(X63) [Kohler G et al., Nature, 256, 495 (1975)] など、イン・ビトロ (in vitro) で増殖可能な骨髄腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法 (Antibodies: A Laboratory Manual) に従い、細胞融合時までに  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

抗体産生細胞と骨髄腫細胞と最小培地 (minimal essential medium、MEM) あるいは PBS (phosphate buffered saline) で洗浄したのち、ポリエチレングリコール-1000 などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させる。融合細胞を HAT 培地 [正常培地 (RPMI-1640 培地に 1.5mmol/l グルタミン、 $5 \times 10^{-5}$ mol/l 2-メルカプトエタノール、 $10 \mu\text{g/ml}$  ジェンタマイシンおよび 10%ウシ胎児血清 (FCS) を加えた培地) に  $10^{-4}$ mol/l ヒポキサンチン、 $1.5 \times 10^{-5}$ mol/l チミジンおよび  $4 \times 10^{-7}$ mol/l アミノプテリンを加えた培地] に懸濁させ、96 穴プレートに分注して培養する。

培養後、各穴の培養上清の一部をとり酵素免疫測定法により、(2) の抗原のペプチドと同一の配列の非リン酸化ペプチドとは反応せずに、抗原としたリン酸化ペプチドと特異的に反応するものを選択する。選択した穴内の細胞から、限界希釈法によりクローニングを 2 回繰り返す [1 回目は、HT 培地 (HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地)、2 回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものを 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

プリスタン (Pristane、2、6、10、14-テトラメチルペンタデカン) 0.5ml を腹腔内投与し、2 週間飼育した 8~10 週令のマウスまたはヌードマウスに、上記で得られた 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体産生ハイブリドーマ細胞  $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$  細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21 日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該マウスまたはヌードマウスから腹水を採取し、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、

プロテイン A カラムあるいはセルロファイン GSL2000（生化学工業社製）のカラムなどを用いて、IgG あるいは IgM 画分を回収し、精製モノクローナル抗体とする。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの設定は、モノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは波長 280nm での吸光度より算出することができる。

1-2. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質および KDR/Flk-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質をスクリーニングする方法

上記 1-1 で得られた抗体と KDR/Flk-1 を発現する細胞を用いて、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質または 1175 位のチロシンリン酸化を阻害する物質をスクリーニングすることができる。具体的には、該抗体、KDR/Flk-1 を発現する細胞および／または被験試料とを接触させ、抗体と KDR/Flk-1 の結合や、リン酸化の誘導または抑制などを、定性的または定量的に調べることにより、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質または 1175 位のチロシンリン酸化を阻害する物質が選択される。

被験物質としては、KDR/Flk-1 を発現する細胞の培養系に加えることができるものであれば特に限定されず、例えば、低分子化合物、高分子化合物、有機化合物、無機化合物、蛋白質、遺伝子、ウイルス、細胞などが挙げられる。遺伝子を除く被験物質は、培養培地中に直接添加すればよい。

遺伝子を効率的に培養系に導入する方法としては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス等のウイルスベクターに乗せて培養系に添加する方法、またはリポソームなどの人工的なベジクル構造に封入して培養系に添加する方法などが挙げられる。その具体的例としては、組換えウイルスベクターを用いた遺伝子解析に関する報告 [Proc. Na



tl. Acad. Sci. USA, 92, 6733 (1995); Nucleic Acids Res., 18, 3587, 1990; Nucleic Acids Res., 23, 3816 (1995)] を挙げることができる。

本発明のスクリーニング方法としては、免疫学的測定法を利用したスクリーニング方法があげられる。免疫学的測定法としては、任意の公知の免疫学的測定方法があげられる。免疫学的測定法としては、例えば、競合法、サンドイッチ法[免疫学イラストレイテッド 第5版(南光堂)]があげられるが、サンドイッチ法が好ましい。

サンドイッチ法を利用したスクリーニング方法とは、具体的には、固相に第一の抗体を結合させた後、被験物質と、VEGF 含有培地で培養した KDR/F1k-1 発現細胞とを反応させた後、標識した第二の抗体を反応させる方法である。

サンドイッチ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、上述した Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub> などの抗体断片を用いてもよい。サンドイッチ法で用いる 2 種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体あるいは抗体フラグメントの組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体あるいは抗体フラグメントの組み合わせでもよいが、高感度のサンドイッチ ELISA を行うためには、特異的な結合活性を有するモノクローナル抗体が好ましい。例えば、KDR/F1k-1 の細胞外領域を認識する抗体またはその抗体断片と、前記 1 で製造された 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体またはその抗体断片との組み合わせがあげられる。固相に結合させる抗体および標識する抗体は、2 つの抗体のいずれでもよい。

標識方法としては、放射性同位元素、酵素、蛍光、発光などがあげられるが、好ましくは酵素での標識があげられる。

以下にスクリーニング方法を具体的に説明する。

96 穴プレートに 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体を分注し、4℃で一晩放置して吸着させる。洗浄後、1%牛血清アルブミンを含む P B S を加えて、室温で 1 時間静置して非特異的吸着をブロックする。P B S で洗浄後、VEGF を含ま

ない培地で培養した KDR/F1k-1 を発現する細胞の細胞抽出液を分注した後に、VEGF および試験物質を添加して KDR/F1k-1 を活性化し反応させる。洗浄後にウェルに結合した KDR/F1k-1 の量を、1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体とは別のエピトープを認識する抗体例えば KDR/F1k-1 の細胞外領域を認識する抗 KDR/F1k-1 抗体を用いて酵素免疫測定法により測定する。試験物質を添加しない場合の KDR/F1k-1 の結合量と試験物質を添加した場合の結合量を測定し比較することにより、1175 位のチロシンリン酸化を阻害する物質、あるいは、1175 位のチロシンリン酸と PLC- $\gamma$  などのアダプター分子の結合を阻害する物質をスクリーニングすることができる。

### 1-3. ドラッグデザインによる 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質および KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質の取得方法

本発明の 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質は、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 の細胞内領域と情報伝達分子との構造を、X 線結晶解析または NMR 解析などの構造解析により得られた数値をもとに、計算機上のシミュレーションを行って KDR/F1k-1 の細胞内領域と情報伝達分子との結合領域を推定し、かつそれらの分子間結合を阻害することが可能な化合物を既存のデータベースあるいはコンピューターソフトを用いた構築により、取得することができる。

また、KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質は、1175 位がリン酸化される際のチロシンキナーゼの構造を、X 線結晶解析または NMR 解析などによる構造解析により得られた数値をもとに、計算機上のシミュレーションにより構造を推定し、新規化合物を既存のデータベースから選択するか、あるいはコンピューターソフトを用いた構築により、取得することができる。

ここで、(1) 構造未知のタンパク質の立体構造を既知類似酵素の立体構造から自動構築する場合には、例えば、Insight II/Modeler (Accelrys) が用いられる。

(2) タンパク質の立体構造からリガンド結合部位を予測する場合には、例えば、Cerius2/LigandFit (Accelrys) が用いられる。(3) タンパク質の立体構造がわかっていて、リガンド結合部位がだいたい（領域として）わかっているときに、リガンドの結合様式を予測する場合、あるいは、任意の化合物が結合（阻害）するかどうか予測する場合には、例えば、Insight II/Affinity (Accelrys)、GOLD (CCDC)、FlexX (Tripos)、DOCK (Prof. Kuntz) が用いられる。(4) リガンド結合部位から、結合（阻害）すると予想される化合物を生成する場合には、例えば、Insight II/Ludi (Accelrys) が用いられる。

上記で取得した化合物は、前記 1-2 のスクリーニング方法で示したアッセイ方法を用いることにより、阻害活性を有しているか否かを確認することができる。

## 2. 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体による KDR/F1k-1 の情報伝達の阻害および細胞増殖の阻害

本発明で使用される 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質または KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質が、KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害すること、細胞増殖あるいは血管新生を阻害することは、以下の方法で確認することができる。

### (1) PLC- $\gamma$ と KDR/F1k-1 の結合の阻害

KDR/F1k-1 発現細胞、例えば NIH3T3-KDR [Sawano A et al., Cell Growth Differ., 7, 213 (1996)] を VEGF で刺激して KDR/F1k-1 を活性化した後に細胞抽出液を調製する。ここに PLC- $\gamma$  あるいは PLC- $\gamma$  の SH2 ドメイン、例えば GST (グルタチオン S トランスフェラーゼ) と PLC- $\gamma$ C 末端側 SH2 ドメイン融合蛋白質 [サンタ・クルズ・バイオテクノロジー社 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 製] を添加し結合させる。この系に該抗体を添加した場合と添加しない場合について、PLC- $\gamma$  あるいは PLC- $\gamma$  の SH2 ドメインを免疫沈降やグルタチオン固定化ビーズ等により分離した後に、抗 KDR/F1k-1 抗体を用いたイムノブロットを行い、免疫沈

降物中の KDR/Flk-1 の量を比較する。該抗体を添加した場合に、非添加時と比較して免疫沈降物中の KDR/Flk-1 の量が減少していれば、*in vitro* で該抗体が KDR/Flk-1 と PLC- $\gamma$  の結合を阻害しているといえる。

また、KDR/Flk-1 を発現している血管内皮細胞例えば、洞様血管内皮細胞やヒト臍帯静脈血管内皮細胞の中に該抗体をマイクロインジェクションにより注入した細胞と注入しない細胞について、VEGF により刺激した後に細胞抽出液を調製する。それぞれの細胞抽出液について上記と同様に抗 PLC- $\gamma$  抗体により PLC- $\gamma$  を免疫沈降した後に、免疫沈降物について抗 KDR/Flk-1 抗体を用いたイムノブロットを行い、免疫沈降物中の KDR/Flk-1 の量を比較する。該抗体を注入した場合に、非注入時と比較して免疫沈降物中の KDR/Flk-1 の量が減少していれば、*in vivo* で該抗体が KDR/Flk-1 と PLC- $\gamma$  の結合を阻害しているといえる。免疫沈降やイムノブロットは *Antibodies: A Laboratory Manual* 等の実験書に記載の方法で行うことができる。

## (2) PLC- $\gamma$ リン酸化の阻害

(1) と同様にして該抗体を細胞内に注入した血管内皮細胞と注入しない細胞から VEGF 刺激後に調製した細胞抽出液について、抗 PLC- $\gamma$  抗体により PLC- $\gamma$  を免疫沈降した後に、免疫沈降物について抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロットを行い、免疫沈降物中のリン酸化した PLC- $\gamma$  の量を比較する。該抗体を注入した場合に、非注入時と比較して免疫沈降物中のリン酸化した PLC- $\gamma$  の量が減少していれば、*in vivo* で該抗体が PLC- $\gamma$  のリン酸化すなわち PLC- $\gamma$  の活性化を阻害しているといえる。

## (3) MAP キナーゼ活性化の阻害

(1) と同様にして該抗体を細胞内に注入した血管内皮細胞と注入しない細胞から VEGF 刺激後に調製した細胞抽出液について、リン酸化 MAP キナーゼに特異的な抗体を用いたイムノブロットを行い、リン酸化した MAP キナーゼの量を比較する。

該抗体を注入した場合に、非注入時と比較して細胞内のリン酸化した MAP キナーゼの量が減少していれば、in vivo で該抗体が MAP キナーゼのリン酸化すなわち MAP キナーゼの活性化を阻害しているといえる。

#### (4) 細胞増殖の阻害

(1) と同様にして該抗体を細胞内に注入した血管内皮細胞と注入しない細胞について、VEGF で刺激する際にブロモデオキシウリジン (BrdU) を添加し、VEGF 刺激により新たに合成された DNA を標識する。細胞を免疫組織染色用に固定化し、抗 BrdU 抗体で染色することにより、新たに DNA が合成された細胞を検出する。該抗体を注入した場合に、非注入時と比較して染色された細胞数が減少していれば、in vivo で該抗体が DNA の合成すなわち細胞増殖のシグナルを阻害しているといえる。あるいは、BrdU のかわりに [<sup>3</sup>H] チミジンを添加して培養して新たに合成された DNA を標識した後、細胞をグラスフィルター等で回収して細胞の放射能を測定することにより、DNA 合成量を測定する。該抗体を注入した場合に、非注入時と比較して放射能が減少していれば、in vivo で該抗体が DNA の合成すなわち細胞増殖のシグナルを阻害しているといえる。

### 3. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質および KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質の用途

本発明の 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質、KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質は、KDR/F1k-1 の情報伝達分子の結合を阻害し、細胞増殖を阻害する活性または血管新生を阻害する活性を有している。これらの性質を有する物質は、以下の用途に使用することができる。

(1) 本発明の 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質および KDR/Flk-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質の使用法

前記 2 より、本発明の 1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体は、KDR/Flk-1 の情報伝達分子の結合を阻害し、細胞増殖または血管新生などを阻害するために用いることができる。

固形腫瘍の増殖など細胞増殖に関わる疾患、または転移形成、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症などの血管新生に関わる疾患の診断または治療に用いることができる。

また、血管内皮細胞などの細胞内における細胞増殖の情報伝達には、KDR/Flk-1 が重要であるため、1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体は、KDR/Flk-1 を介した血管内皮の増殖を阻害するために用いることができる。従って、ヒト型 VEGF 受容体 KDR の情報伝達を阻害できれば、ヒトにおける固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬等の異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断または治療に用いることができる。

(2) 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質または KDR/Flk-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質を有効成分として含有する薬剤

これまでに、このような阻害剤としては、1) 細胞外ドメインに対する中和抗体、可溶性 KDR/Flk-1 などの、KDR/Flk-1 と VEGF との結合を阻害する物質、2) キナーゼ阻害剤など細胞内のキナーゼを阻害することにより以降の情報伝達を阻害する物質が知られている。これらの物質に対し、前記 2 で確認される性質を有する、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質または KDR/Flk-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質は、

新規なメカニズムの VEGF-KDR/Flk-1 の情報伝達の阻害剤、すなわち細胞増殖阻害剤および血管新生阻害剤として使用することができる。

1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質または KDR/Flk-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該化合物または抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物または抗体を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物または抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

本医薬組成物の投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、ヒトを含む哺乳動物に対し、各化合物または抗体として 0.1~20mg/kg/日投与する。投与は、各化合物または抗体を同時に投与する場合は、1 日 1 回（単回投与または連日投与）または間歇的に 1 週間に 1~3 回、2、3 週間に 1 回、別々に投与する場合は、各々の化合物または抗体を、適宜時間をおいて、1 日 1 回（単回投与または連日投与）または間歇的に 1 週間に 1~3 回、2、3 週間に 1 回静脈注射により行う。

### (3) 血管新生の早期検出

前記 1-1 で製造された本発明の抗体が、リン酸化された KDR/F1k-1、すなわち情報伝達を行っている KDR/F1k-1 のみを検出できることを利用して、臨床組織材料について、該抗体を用いた免疫組織染色を行うことができる。染色された部位は、KDR/F1k-1 が活性化していることを示すため、染色部位を観察することにより新生血管を検出するよりも早い時期に、血管新生の初期の段階またはこれから血管新生がおこる部位を検出することができる。免疫組織染色は、Antibodies: A Laboratory Manual 等の実験書に記載する方法で行うことができる。



#### (4) VEGF-KDR/Flk-1 の系での情報伝達を阻害するか否かの判定方法

被験物質が実際に、動物個体において VEGF-KDR/Flk-1 の系の情報伝達の阻害効果があるかどうかを判定するには、非ヒト動物、例えばマウスに腫瘍を移植し、被験物質を投与した場合と非投与の場合で、移植した腫瘍の成長や腫瘍周辺の血管新生を観察し、比較する方法が用いられてきたため、効果を判定するまでに数週間を要した。

本発明は、本発明の抗体が、情報伝達を行っている KDR/Flk-1 のみを検出できることを利用し、以下の方法で短期間に被験物質が VEGF の阻害効果を有するか否かを判定することができる。被験物質としては、上記スクリーニング方法で例示された物質があげられる。

被験物質を投与したマウスおよび未投与マウス（コントロール）について、被験物質を投与した 1～2 日後にそれぞれ血管内皮を採取し、1175 位チロシンリン酸化特異的抗 KDR 抗体による免疫組織染色を行う。該抗体による染色量は、リン酸化した KDR/Flk-1 の量を示す。したがって、被験物質を投与したマウス血管内皮の染色量が未投与マウス血管内皮の染色量と比較して減少していれば、動物個体において VEGF-KDR/Flk-1 の系の情報伝達が阻害されていると判定することができる。

以下に実施例により、本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は KDR/Flk-1 の 1175 位のリン酸化チロシンに特異的な抗体（以下、抗 PY1175 抗体とする）を用いたイムノブロットによる、種々の細胞内の 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/Flk-1 の検出を示す図である。第 1A 図は左から天然型 KDR/Flk-1 (Wt)、Y1175F、Y1214F、Y801F の各変異型 KDR/Flk-1 を発現させた細胞株 MSS31 の細胞抽出液のイムノブロットを示す。各レーンの－は VEGF で刺激しなかった細胞、＋は VEGF で刺激した細胞の結果である。第 1B 図は左から

NIH3T3-KDR、NIH3T3-Flt-1、HeLa の各細胞の細胞抽出液のイムノブロットを示す。－は刺激しなかった細胞、VEGF、bFGF、PDGF、EGF はそれぞれで刺激した細胞の結果である。第 1C 図は左からヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) およびラット洞様血管内皮細胞 (ratSEC) の細胞抽出液のイムノブロットを示す。－は刺激しなかった細胞、VEGF、bFGF、HGF はそれぞれで刺激した細胞の結果である。第 1A～C 図ともに上段は抗 PY1175 抗体を用いたイムノブロット、中段は抗リン酸化チロシン抗体 (抗 PY 抗体) を用いたイムノブロット、下段は抗 KDR/Flk-1 抗体を用いたイムノブロットの結果を示す。矢印は上段および中段は自己リン酸化した KDR/Flk-1 (pKDR/Flk-1) のバンドの位置を示し、下段は KDR/Flk-1 (自己リン酸化しているもの、していないもの両者を含む) のバンドの位置を示す。

第 2 図は KDR/Flk-1 を発現させた MSS31 細胞における *in vivo* での KDR/Flk-1 と PLC- $\gamma$  の結合を示す図である。Wt は天然型 KDR/Flk-1、Y1175F は Y1175F 変異型 KDR/Flk-1 を発現させた細胞、－は VEGF で刺激しなかった細胞、+は VEGF で刺激した細胞それぞれの抗 KDR/Flk-1 抗体による免疫沈降物について、上段は抗 PLC- $\gamma$  抗体、下段は抗 KDR/Flk-1 抗体を用いたイムノブロットの結果を示す。矢印は上段は PLC- $\gamma$ 、下段は KDR/Flk-1 のバンドの位置を示す。TCL は、MSS31 細胞の細胞抽出液 (免疫沈降なし) の抗 PLC- $\gamma$  抗体によるイムノブロットの結果を示す。

第 3 図は PLC- $\gamma$  の SH2 ドメインと KDR/Flk-1 の *in vitro* での結合を示す図である。GST あるいは GST と種々の蛋白質の SH2 ドメインの融合蛋白質と NIH3T3-KDR の細胞抽出液を反応させ、グルタチオンアフィニティーカラムにより単離した GST あるいは GST と各 SH2 ドメインの融合蛋白質について、上段は抗 KDR/Flk-1 抗体、下段は抗 GST 抗体を用いたイムノブロットの結果を示す。－は VEGF で刺激しなかった細胞、+は VEGF で刺激した細胞の細胞抽出液を用いた場合である。左から GST、GST-PLC- $\gamma$  SH2-SH2、GST-PLC- $\gamma$  N-SH2、GST-PLC- $\gamma$  C-SH2 を用いた場合である。矢印は上段は KDR/Flk-1、下段は GST あるいは GST と各 SH2 ドメ

インの融合蛋白質のバンドの位置を示す。TCL は、NIH3T3-KDR の細胞抽出液のみ（アフィニティーカラムなし）のイムノブロットの結果を示す。

第 4 図は PLC- $\gamma$  の SH2 ドメインと KDR/Flk-1 の *in vitro* での結合を示す図である。GST あるいは GST と種々の蛋白質の SH2 ドメインの融合蛋白質と NIH3T3-KDR の細胞抽出液を反応させ、グルタチオンアフィニティーカラムにより単離した GST あるいは GST と各 SH2 ドメインの融合蛋白質について、上段は抗 KDR/Flk-1 抗体、下段は抗 GST 抗体を用いたイムノブロットの結果を示す。－は VEGF で刺激しなかった細胞、＋は VEGF で刺激した細胞の細胞抽出液を用いた場合である。左から GST、GST-PLC- $\gamma$  C-SH2、GST-Grb2 SH2、GST-PI3K N-SH2 を用いた場合である。矢印は上段は KDR/Flk-1、下段は GST あるいは GST と各 SH2 ドメインの融合蛋白質のバンドの位置を示す。TCL は、NIH3T3-KDR の細胞抽出液のみ（アフィニティーカラムなし）のイムノブロットの結果を示す。

第 5 図は抗 PY1175 抗体および PY1175 ペプチドによる PLC- $\gamma$  の SH2 ドメインと KDR/Flk-1 の *in vitro* での結合の阻害を示す図である。GST-PLC- $\gamma$  C-SH2 と NIH3T3-KDR の細胞抽出液および抗体/ペプチドを添加して反応させた後に GST-PLC- $\gamma$  C-SH2 を単離したものについての、上段は抗 KDR/Flk-1 抗体、下段は抗 GST 抗体を用いたイムノブロットの結果を示す。－は VEGF で刺激しなかった細胞、＋は VEGF で刺激した細胞の細胞抽出液を用いた場合である。第 5A 図は左から、添加なし、ウサギ IgG、抗 PY1175 抗体を添加した場合、第 5B 図は左から、添加なし、PY1175 ペプチド、Y1175 ペプチドを添加した場合の結果である。矢印は上段は KDR/Flk-1、下段は GST-PLC- $\gamma$  C-SH2 のバンドの位置を示す。TCL は、NIH3T3-KDR の細胞抽出液のみ（アフィニティーカラムなし）のイムノブロットの結果を示す。

第 6 図は抗 PY1175 抗体を注入したラット洞様血管内皮細胞における VEGF による細胞増殖シグナルの阻害を示す図である。左から抗体の注入なし（VEGF 刺激なし）、抗体の注入なし（VEGF 刺激）、ウサギ IgG 注入（VEGF 刺激）、抗 PY1175 抗体

注入 (VEGF 刺激) の場合の、BrdU を取り込んだ細胞の割合 (%) を示すグラフである。

第 7 図は PY1175-THY または Y1175-THY をそれぞれ吸着させたプレートに、1 次抗体として得られたハイブリドーマ KM3035 および KM3036 の生産したモノクローナル抗体を含んだ培養上清、該上清の希釈液を反応させ、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリンを反応させた結果を示すグラフである。

第 8 図は、PY1175-THY を固相化したプレートを作製し、段階的に希釈したペプチド PY1175 およびペプチド Y1175 をそれぞれ分注後、実施例 1 で得られた KDR/F1k-1 の 947~966 位の合成ペプチドを免疫して得られたウサギポリクローナル抗体またはハイブリドーマ KM3035 の生産したモノクローナル抗体を含む培養上清をそれぞれ希釈して分注して反応させ、希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリンを加えて反応させた後に、ABTS [2, 2-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム] 基質液を用いて発色させた結果を示すグラフである。

第 9 図は、VEGF で刺激した NIH3T3-KDR およびコントロールの VEGF 未刺激細胞から細胞抽出液を調製し、抗 KDR/F1k-1 モノクローナル抗体を用いたイムノブロットを行った結果を示す図である。第 9A 図は抗 KDR/F1k-1 モノクローナル抗体を用いた結果で、第 9B 図は抗 PY1175 モノクローナル抗体を用いた結果である。各レーンの-は VEGF で刺激しなかった細胞、+は VEGF で刺激した細胞の結果である。

#### 発明を実施するための最良の形態

実施例 1 1175 位チロシンのリン酸化を検出できる抗体

(1) KDR/F1k-1 の 1175 位のチロシンのリン酸化を特異的に検出できる抗体の作製

配列番号 1 に示す配列 (ヒト KDR/F1k-1 のアミノ酸配列の 1171~1180 番めの配列の N 末端にシステインを付加した配列で、1175 位に相当するチロシンがリン酸

化されている配列) のペプチド PY1175 を化学合成した。このペプチド PY1175 をシステインを利用して KLH とのコンジュゲートにしたものを抗原として、ウサギを免疫することにより抗血清を得た。ハイトラップ NHS 活性化カラム (HiTrap NHS-activated column、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製) にペプチド PY1175 を固定化し、PY1175 アフィニティーカラムを作製し、得られた抗血清を通すことにより PY1175 と結合する抗体を精製した。さらに、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列 (PY1175 と同じアミノ酸配列だが、チロシンがリン酸化されていない配列) を有するペプチド Y1175 を化学合成し、ハイトラップ NHS 活性化カラムに固定化して Y1175 アフィニティーカラムを作製し、上記の PY1175 アフィニティーカラムにより精製した抗体を通すことにより、リン酸化チロシン以外の部分をエピトープとする抗体を Y1175 アフィニティーカラムに結合させて除き、KDR/F1k-1 の 1175 位のリン酸化チロシンに特異的な抗体 (抗 PY1175 抗体) だけを精製した。なお、マウス KDR/F1k-1 (GenBank アクセス番号 X59397) には PY1175 の 2~10 番めと同じ配列 (Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro) が 1169~1179 番めに存在するので、上記のようにして調製した抗 PY1175 抗体は、ヒト KDR/F1k-1 だけでなくリン酸化したマウス KDR/F1k-1 も認識できると考えられる。

## (2) 抗 PY1175 抗体の特異性

マウスの内皮細胞系の細胞株である MSS31 細胞 [Yanai N et al., Cell Struct. Funct., 16, 87 (1991)] は、上記文献の培養条件で培養した。この細胞に天然型 KDR/F1k-1、1175 位のチロシンをフェニルアラニンに置換した Y1175F、1214 位のチロシンをフェニルアラニンに置換した Y1214F、801 位のチロシンをフェニルアラニンに置換した Y801F の各変異型 KDR/F1k-1 発現アデノウイルスベクター (参考例 1 参照) を 37℃で 1 時間感染させた。それぞれの細胞を感染後 2 日間培養した後、培地を 0.1%FCS を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に交換して 12 時間培養し、10ng/ml VEGF [Cohen T et al., Growth Fact., 7, 131 (1992)]

の記載に従って、VEGF 発現昆虫細胞 Sf-9 の培養上清からヘパリンカラムクロマトグラフィーにより精製した組換えヒト VEGF を添加して 37℃で 5 分間培養した。この細胞と、コントロールの VEGF を添加しなかった細胞について、細胞溶解用緩衝液 [50mmol/l HEPES (pH7.4)、150mmol/l NaCl、10%グリセロール、1%トリトン X-100、5mmol/l EDTA、2%アプロチニン、1mmol/l PMSF、50mmol/l NaF、10mmol/l ピロリン酸ナトリウム、2mmol/l バナジン酸ナトリウム] を用いて細胞抽出液を調製した。それぞれの細胞抽出液について抗 PY1175 抗体を用いてイムノブロットを行った。以降のイムノブロットは、文献 [Takahashi T & Shibuya M, *Oncogene*, 14, 2079 (1997)] の方法で行った。また、同時に抗 KDR/Flk-1 抗体 [化学合成した配列番号 6 に示す配列のペプチド (ヒト KDR/Flk-1 のアミノ酸配列の 947~966 番目に相当する) を抗原として、ウサギを免疫して作製したポリクローナルな抗血清] および抗リン酸化チロシン抗体 [ICN バイオケミカルズ (ICN Biochemicals) 社製] を用いたイムノブロットを行い、KDR/Flk-1 (リン酸化の有無にかかわらず)、自己リン酸化した KDR/Flk-1 を含むリン酸化蛋白質をそれぞれ検出した。その結果を第 1A 図に示したが、1175 位がフェニルアラニンのためリン酸化できない Y1175F は VEGF 添加細胞でも検出されないのに対し、Y1175F 以外の各 KDR/Flk-1 は、VEGF を添加した細胞のみに抗 PY1175 抗体でバンドが検出され、内皮細胞の細胞内でも VEGF に依存して 1175 位チロシンがリン酸化を受けることが見出された。なお、抗 PY1175 抗体では、VEGF を添加した細胞でのみバンドが検出できたことから、抗 PY1175 抗体は KDR/Flk-1 の 1175 位チロシンの自己リン酸化を特異的に検出できることが確認された。

また、他のチロシンキナーゼ型受容体である bFGF 受容体、PDGF 受容体、VEGF 受容体 Flt-1、PDGF 受容体、EGF 受容体を発現している細胞として、KDR/Flk-1 を恒常的に発現させた NIH3T3 細胞である NIH3T3-KDR [天然型 KDR/Flk-1 の他に内在性の bFGF 受容体および PDGF 受容体を発現、Sawano A et al., *Cell Growth Differ.*, 7, 213 (1996)]、Flt-1 を恒常的に発現させた NIH3T3 細胞である NIH3T3-Flt-1 [Sawano A et al., *Cell Growth Differ.*, 7, 213 (1996)]、HeLa

細胞（内在性 EGF 受容体を発現、ATCC 番号 CCL-2）を培養した。培養は、NIH3T3-KDR および NIH3T3-Flt-1 は、10%FCS、2mmol/l L-グルタミン、40  $\mu$ g/ml カナマイシン、200  $\mu$ g/ml G418 を添加した DMEM で、HeLa 細胞は 10%FCS、2mmol/l L-グルタミン、40  $\mu$ g/ml カナマイシンを添加した DMEM を用いて行った。培地の血清濃度を 0.1%に低下させて 6～7 時間培養後、それぞれのリガンドである VEGF、ヒト bFGF [オンコジーン・サイエンス社製 (Oncogene Science Inc.)]、PDGF B/B [ロシュ (Roche) 社製]、EGF (東洋紡社製) で刺激した細胞と刺激しない細胞の各細胞抽出液について、抗 PY1175 抗体および抗 KDR/Flk-1 抗体、抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロットを行った。その結果を第 1B 図に示したが、抗リン酸化チロシン抗体では、全てのチロシンキナーゼ受容体のリガンド依存的な自己リン酸化が検出されたのに対し、抗 PY1175 抗体では NIH3T3-KDR を VEGF で刺激した場合にのみバンドが検出された。したがって、全てのリン酸化受容体を検出できる抗リン酸化チロシン抗体と異なり、抗 PY1175 抗体は、1175 位のチロシンがリン酸化された KDR/Flk-1 を特異的に認識することが確認された。

## 実施例 2 抗 PY1175 抗体を用いたイムノブロットによる内在性自己リン酸化 KDR/Flk-1 の検出

内在性 KDR/Flk-1 を発現しているヒト臍帯静脈内皮細胞（森永生化学研究所社製）を 5%FCS および各種増殖因子を添加した完全培地（日水製薬社製）またはヒューメディア-EG2 培地（HuMedia-EG2、倉敷紡績社製）で培養した。また、同様に内在性 KDR/Flk-1 を発現しているラット洞様血管内皮細胞をラット肝臓から文献 [Yamane A et al., Oncogene 9, 2683 (1994)] に記載の方法で単離し、10ng/ml VEGF を含むヒューメディア-EG2 培地で培養した。これらの細胞について、培地を 0.1%FCS を含む DMEM に交換して 6～7 時間培養後、VEGF、bFGF、HGF [R アンド D・システムズ社 (R & D Systems Inc.) 製] を添加して刺激した。VEGF 等で刺激した細胞とコントロールの刺激しなかった細胞について細胞抽出液を調製し、抗 PY1175 抗体、抗 KDR/Flk-1 抗体、抗リン酸化チロシン抗体を用いたイム

ノブロットを行った。その結果を第 1C 図に示したが、抗 PY1175 抗体ではヒト臍帯静脈血管内皮細胞およびラット洞様血管内皮細胞の両者とも、VEGF で刺激した場合にのみ、230kDa の 1175 位チロシンリン酸化 KDR/Flk-1 のバンドが検出された。したがって、血管内皮細胞の内在性の KDR/Flk-1 についても、VEGF 依存的に 1175 位チロシンが自己リン酸化を受けることが確認された。

### 実施例 3 抗 PY1175 抗体を用いた免疫組織染色による自己リン酸化 KDR/Flk-1 の検出

ヒト臍帯静脈内皮細胞を培養し、培地を 0.1%FCS を含む DMEM に交換して 6~7 時間培養後、10ng/ml VEGF あるいは 50ng/ml bFGF で刺激した。コントロールの刺激をしなかった細胞、VEGF 刺激後 5 分後の細胞、VEGF 刺激後 30 分後の細胞、bFGF 刺激後 5 分後の細胞をそれぞれアセトン/メタノールで 2 分間処理することにより固定した。固定した細胞を 1%ヤギ血清を含む PBS で 30 分間ブロッキングした後、抗 PY1175 抗体を用いて免疫組織染色を行った。検出は 1/100 に希釈した FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体 [カッペル (Cappel) 社製] で 30 分間処理後、蛍光顕微鏡観察により行った。その結果、VEGF で刺激後 5 分後の細胞でのみ細胞膜および細胞質に KDR/Flk-1 の 1175 位チロシンのリン酸化が検出されたが、VEGF 刺激後 30 分後の細胞ではもはや 1175 位チロシンのリン酸化は検出されなかった。したがって VEGF の刺激によりすぐに 1175 位チロシンのリン酸化がおこるが、このリン酸化は一過的なものであることがわかった。刺激をしなかった細胞、bFGF で刺激をした細胞では染色はみられず、この 1175 位チロシンのリン酸化は VEGF 刺激特異的であった。また VEGF で刺激後 5 分後の細胞の免疫組織染色時に 1  $\mu$ g/ml のペプチド PY1175 を共存させた場合は、染色が阻害された。このように抗 PY1175 抗体はイムノブロットだけでなく、免疫組織染色による KDR/Flk-1 の 1175 位チロシンリン酸化の検出にも有用であった。



#### 実施例 4 抗 PY1175 抗体による PLC- $\gamma$ と KDR/Flk-1 の結合の阻害

##### (1) 細胞内での KDR/Flk-1 と PLC- $\gamma$ の結合

実施例 1 (2) と同様にしてアデノウイルスベクターを用いて MSS31 細胞に天然型 KDR/Flk-1 または Y1175F を発現させ、10ng/ml VEGF で刺激した。この細胞およびコントロールの VEGF 刺激をしなかった細胞の細胞抽出液を調製し、抗 KDR/Flk-1 抗体を用いて免疫沈降を文献 [Takahashi T & Shibuya M, Oncogene, 14, 2079 (1997)] に記載の方法で行った。免疫沈降物について抗 PLC- $\gamma$  抗体 [アップステート・バイオテクノロジー社 (Upstate Biotechnology Inc.) 製] を用いたイムノブロットを行った。その結果を第 2 図に示したが、天然型 KDR/Flk-1 発現細胞では、VEGF で刺激した場合にのみ免疫沈降物から PLC- $\gamma$  が検出され、VEGF の刺激により KDR/Flk-1 に PLC- $\gamma$  が結合することが確認された。一方、Y1175F 発現細胞では、VEGF 刺激した場合でも PLC- $\gamma$  は検出されず、Y1175F には PLC- $\gamma$  は結合しないことがわかった。したがって、1175 位チロシンのリン酸化が PLC- $\gamma$  の結合に必須であることがわかった。

##### (2) in vitro での KDR/Flk-1 と PLC- $\gamma$ の SH2 ドメインとの結合

実施例 1 (2) と同様にして、10ng/ml の VEGF で刺激した NIH3T3-KDR とコントロールの VEGF で刺激しなかった細胞から細胞抽出液を調製した。1.5  $\mu$ g の GST、GST と PLC- $\gamma$  の SH2 ドメイン (2 個) の融合蛋白質 (GST-PLC- $\gamma$  SH2-SH2)、GST と PLC- $\gamma$  の N 末端側の SH2 ドメインの融合蛋白質 (GST-PLC- $\gamma$  N-SH2)、GST と PLC- $\gamma$  の C 末端側の SH2 ドメインの融合蛋白質 (GST-PLC- $\gamma$  C-SH2) [以上全てサンタ・クルズ・バイオテクノロジー社 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 製] を、それぞれグルタチオン-セファロース 4B・ビーズ (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製) に固定化し、細胞抽出液に添加して、4°C で 2 時間反応させた。ビーズを冷却した細胞抽出用緩衝液で 3 回洗浄後、SDS サンプルバッファー中で加熱することにより、ビーズに結合した蛋白質を溶解させ、SDS-PAGE を行った。抗 KDR/Flk-1 抗体を用いたイムノブロットによりそれぞれの添加した蛋白質に結

合した KDR/F1k-1 を検出した。その結果を第 3 図に示したが、GST-PLC- $\gamma$  SH2-SH2 および GST-PLC- $\gamma$  C-SH2 では、VEGF で刺激した細胞で KDR/F1k-1 が検出されたのに対し、GST-PLC- $\gamma$  N-SH2 では KDR/F1k-1 が検出されなかった。したがって、PLC- $\gamma$  の 2 つの SH2 ドメインのうち C 末端側の SH2 ドメインが自己リン酸化した KDR/F1k-1 と結合していることがわかった。

上記と同じ実験を GST、GST-PLC- $\gamma$  C-SH2、GST と Grb2 の SH2 ドメインの融合蛋白質 (GST-Grb2 SH2)、GST と P I 3 キナーゼの N 末端側の SH2 ドメインの融合蛋白質 (GST-PI3K N-SH2) (以上全てサンタ・クルズバイオテクノロジー社製) を用いて行ったところ、第 4 図に示すように GST-PLC- $\gamma$  C-SH2 のみ、VEGF で刺激した細胞で KDR/F1k-1 が検出され、GST-Grb2 SH2、GST-PI3K N-SH2 では KDR/F1k-1 は検出されなかった。したがって自己リン酸化した KDR/F1k-1 は PLC- $\gamma$  の SH2 ドメインとは結合するが、Grb2 や PI3 キナーゼの SH2 ドメインとは結合しないことが確認された。

### (3) 抗 PY1175 抗体による KDR/F1k-1 と PLC- $\gamma$ の結合の阻害

(2) と同様の実験を GST-PLC- $\gamma$  C-SH2 を固定化したビーズと細胞抽出液の反応時に抗 PY1175 抗体、PY1175 ペプチドを共存させて行った。その結果、VEGF 刺激した細胞でも KDR/F1k-1 が検出されず抗 PY1175 抗体、PY1175 ペプチドにより自己リン酸化した KDR/F1k-1 と PLC- $\gamma$  の結合が阻害された。一方、コントロールのウサギ IgG あるいは Y1175 ペプチドを共存させた場合は、阻害はみられなかった (第 5A 図、第 5B 図)。したがって、PLC- $\gamma$  の C 末端側の SH2 ドメインが KDR/F1k-1 の自己リン酸化した 1175 位のチロシンと直接結合していることが強く示唆された。

### 実施例 5 抗 PY1175 抗体による細胞増殖シグナルの抑制

まず初代培養したラット洞様血管内皮細胞をコラーゲンでコートしたスライドガラス上にのせ、チミジンを除いた DMEM にヒューメディア-EG2 調製用増殖添加

剤（倉敷紡績社製）および VEGF を添加した培地で 2 日間培養後、VEGF 非添加の同じ培地で 6～7 時間培養した。細胞に 50ng/ml VEGF を添加して刺激すると同時に、100  $\mu$ mol/l 5-ブロモデオキシウリジン（BrdU、シグマ・アルドリッチ社製）を添加して 20 時間培養し、新たに合成された DNA に取り込ませた。コントロールとして VEGF を添加しなかった細胞についても同様の処理を行った。次いでそれぞれの細胞を 3.7% のホルムアルデヒドを含む PBS で固定化し、メタノールで 10 分間、2mol/l 塩酸で 10 分間処理することにより、細胞の透過性を上げた。この細胞を 1% のヤギ血清を含む PBS で 1/200 希釈した抗 BrdU 抗体（宝酒造社製）と 60 分間反応させ免疫組織染色を行うことにより、BrdU が取り込まれた細胞を検出した。その結果第 6 図に示すように、VEGF で刺激しなかった細胞では BrdU の取り込みがほとんど観察されなかったのに対し、VEGF を添加した場合には、BrdU が取り込まれた細胞が多数観察され、ラット洞様血管内皮細胞における細胞増殖のシグナルは VEGF の刺激に非常に依存していることが確認された。

そこで同様にスライドグラス上で培養したラット洞様血管内皮細胞について、VEGF 非添加の培地で 6～7 時間培養した後に VEGF で刺激する前にこの細胞の細胞質に自動マイクロインジェクター 5246 [エッペンドルフ（Eppendorf）社製] およびマイクロマニピレーター 5171（エッペンドルフ社製）を用いて抗 PY1175 抗体あるいはコントロールのウサギ IgG を注入した。注入の 1～3 時間後に細胞に上記と同様に 50ng/ml VEGF および 100  $\mu$ mol/l BrdU を添加して 20 時間培養し、新たに合成された DNA に取り込ませた。上記と同様にして細胞を固定化およびメタノールおよび塩酸で処理し、1/200 希釈抗 BrdU 抗体（宝酒造社製）と 60 分間反応させた後、1/200 希釈した FITC 標識抗マウス IgG（抗 BrdU 抗体と反応、カッペル社製）および 1/100 希釈した RITC 標識抗ウサギ IgG（抗 PY1175 抗体、ウサギ IgG と反応、カッペル社製）の混合物と 30 分間反応させ免疫組織染色を行うことにより、BrdU が取り込まれた細胞および抗体（抗 PY1175 またはウサギ IgG）が注入された細胞を検出した。その結果第 6 図に示すようにウサギ IgG を注入した細胞では、VEGF の刺激により半数以上の細胞に BrdU が取り込まれ、VEGF の刺激により

細胞の増殖シグナルが伝わり DNA の合成が行われたことが示された。一方、抗 PY1175 抗体を注入した細胞では 1/4 程度の細胞にしか BrdU が取り込まれておらず、VEGF 刺激による細胞の増殖のシグナルが阻害されたことが示された。

#### 実施例 6 KDR/Flk-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を特異的に検出できるモノクローナル抗体の作製

実施例 1 で取得した PY1175 に特異的な抗体は、KDR/Flk-1 の 1175 位のリン酸化チロシンに対するポリクローナル抗体を、Y1175 アフィニティーカラムに通塔させることにより得ることができるが、ポリクローナル抗体の中から PY1175 のみに反応する抗体を得るためには、大量なポリクローナル抗体が必要となる。そこで、PY1175 に特異的なモノクローナル抗体を作製することとした。

##### (1) 免疫原の調製

配列番号 1 記載のアミノ酸配列で表されるペプチド PY1175 は、免疫原性を高める目的で以下の方法で調製した。

まず、KLH (カルビオケム社製) を PBS に溶解して 10mg/ml に調製し、1/10 容量の 25mg/ml MBS [N-(m-Maleimidobenzoyloxy)succinimide; ナカライテスク社製] を滴下して 30 分間攪拌反応させた。あらかじめ PBS で平衡化したセファデックス G-25 カラムなどのゲルろ過カラムでフリーの MBS を除いて得られた KLH-MBS 2.5mg を 0.1M リン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) に溶解した 1mg のペプチド PY1175 と混合し、室温で 3 時間、攪拌反応させた。反応後、PBS で透析したものを免疫原として用いた。

##### (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調整

実施例 6 (1) で調製した化合物 PY1175 の KLH コンジュゲート 50 $\mu$ g を水酸化アルミニウムアジュバント (Antibodies: A Laboratory Manual, p99) 2mg および百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1 $\times 10^9$  細胞とともに 4 週令雌 SD ラット 3

匹に投与した。投与 2 週間後より、KLH コンジュゲート  $50 \mu\text{g}$  を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。該ラットの心臓より部分採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。

脾臓を MEM (Minimum Essential Medium) 培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 ( $250 \times g$ , 5 分間) した。得られた沈殿画分にトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.6) を添加し、1~2 分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分 (細胞画分) を MEM 培地で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

### (3) 酵素免疫測定法 (バインディング ELISA)

アッセイ用の抗原には実施例 1 (1) で得られた PY1175 および Y1175 をサイログロブリン (以下、THY と略す) とそれぞれコンジュゲート (PY1175-THY および Y1175-THY と称す) したものをを用いた。作製方法は実施例 6 (1) に記した通りであるが、架橋剤には MBS の代わりに SMCC [4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylic acid N-hydroxysuccinimido ester; シグマ社製] を用いた。96 穴の EIA 用プレート (グライナー社製) に、上記のように調製した PY1175-THY または Y1175-THY を  $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{l}$ /穴でそれぞれ分注し、4 度で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1%牛血清アルブミン (BSA)/ダルベッコリン酸バッファー (Phosphate buffered saline: PBS) を  $100 \mu\text{l}$ /穴加え、室温で 1 時間放置し、残っている活性基をブロックした。

放置後、1%BSA/PBS を捨て、該プレートに一次抗体として被免疫ラット抗血清またはハイブリドーマ培養上清を  $50 \mu\text{l}$ /穴分注し、2 時間放置した。該プレートを 0.05%ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート [(ICI 社商標 Tween 20 相当品: 和光純薬社製)]/PBS (以下 Tween-PBS と表記) で洗浄後、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリンを  $50 \mu\text{l}$ /穴加えて室温、1 時間放置した。該プレートを Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液

[1mmol/l ABTS を 0.1mol/l クエン酸バッファーに溶解 (pH4.2)] を添加し、発色させ OD415nm の吸光度をプレートリーダー (Emax ; Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

#### (4) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株 P3X63Ag8U.1 (P3-U1 : ATCC より購入) を正常培地 (10%ウシ胎児血清添加 RPMI 培地) で培養し、細胞融合時に  $2 \times 10^7$  個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

#### (5) ハイブリドーマの作製

実施例 6 (2) で得られたラット脾細胞と実施例 6 (4) で得られた骨髓腫細胞とを 10 : 1 になるよう混合し、遠心分離 (250×g、5 分間) した。得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 1g、MEM 培地 1ml およびジメチルスルホキシド 0.35ml の混液を  $10^8$  個のマウス脾細胞あたり 0.5ml 加え、該懸濁液に 1~2 分間毎に MEM 培地 1ml を数回加えた後、MEM 培地を加えて全量が 50ml になるようにした。

該懸濁液を遠心分離 (900rpm、5 分間) し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞を、メスピペットによる吸込み吸出しでゆるやかに HAT 培地 [10%ウシ胎児血清添加 RPMI 培地に HAT Media Supplement (インビトロジェン社製) を加えた培地] 100ml 中に懸濁した。該懸濁液を 96 穴培養用プレートに  $200 \mu\text{l}$ /穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で 10~14 日間培養した。

培養後、培養上清を実施例 6 (3) に記載した酵素免疫測定法で調べ、ペプチド PY1175 に反応してペプチド Y1175 に反応しない穴を選択した。しかしながら、大部分の細胞培養上清は PY1175 および Y1175 のいずれにも反応していた。そのため、上記工程を繰り返し、PY1175 に反応して Y1175 に反応しない穴を選択し、そこに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを 2 回繰り返し、抗 PY1175 モノ

クローナル抗体を生産するハイブリドーマ KM3035 および KM3036 を確立した。ハイブリドーマ KM3035 は、平成 13 年 9 月 13 日付けで、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6）に FERM BP-7729 として寄託されている。

#### (6) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した 8 週令ヌード雌マウス (BALB/c) に実施例 6 (5) で得られたハイブリドーマ株を  $5 \sim 20 \times 10^6$  細胞/匹それぞれ腹腔内注射した。10～21 日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取 (1～8ml/匹) した。

該腹水を遠心分離 ( $1200 \times g$ 、5 分間) し、固形分を除去した。

精製 IgG モノクローナル抗体は、カプリル酸沈殿法 (Antibodies: A Laboratory Manual) により精製することにより取得した。モノクローナル抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いた ELISA 法により決定した。モノクローナル抗体 KM3035 およびモノクローナル抗体 KM3036 のサブクラスは共に IgG2a であった。

#### 実施例 7 モノクローナル抗体の反応性の検討

##### (1) 抗原固相系における抗原化合物との反応性 (バインディング ELISA)

実施例 6 で得られたモノクローナル抗体の抗原ペプチドとの反応性は、実施例 6 (3) に示した方法に準じて調べた。PY1175-THY または Y1175-THY をそれぞれ吸着させたプレートに、1 次抗体として実施例 6 (5) で得られたハイブリドーマ KM3035 および KM3036 の生産したモノクローナル抗体を含んだ培養上清、該上清を  $5^1$ 、 $5^2$ 、 $5^3$  および  $5^4$  倍希釈した希釈液を反応させ、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリンを反応させた。結果を第 7 図に示す。ハイブリドーマ KM3035 および KM3036 が生産したモノクローナル抗体はいずれも、ペプチド PY1175 にのみ反応し、ペプチド Y1175 には全く反応しなかった。

(2) 抗原液相系における抗原化合物に対する反応性 (インヒビション ELISA)

実施例 6 (3) に示した方法に準じて PY1175-THY を固相化したプレートを作製し、 $20 \mu\text{g/ml}$  より 5 倍希釈で段階的に希釈したペプチド PY1175 およびペプチド Y1755 を  $50 \mu\text{l/穴}$  でそれぞれ分注後、ハイブリドーマ KM3035 または KM3036 の生産したモノクローナル抗体を含む培養上清をそれぞれ希釈して (希釈倍率; KM3035 :  $\times 120$ 、KM3036 :  $\times 1000$ )  $50 \mu\text{l/穴}$  で分注し、室温で 2 時間反応させた。ウェルを Tween-PBS で洗浄後、希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン (ダコ社製) を  $50 \mu\text{l/穴}$  で加えて室温、1 時間反応させ、Tween-PBS で洗浄後 ABTS 基質液を用いて発色させ OD415nm の吸光度をプレートリーダー (Emax; 和光純薬社製) にて測定した。

第 8 図に示すように、ハイブリドーマ KM3035 および KM3036 が生産したモノクローナル抗体はいずれも液相系においてペプチド PY1175 にのみに反応した。

実施例 8 モノクローナル抗体 KM3035 を用いたイムノブロットによる自己リン酸化 KDR/F1k-1 の検出

実施例 1 (2) と同様にして、 $10\text{ng/ml}$  の VEGF で刺激した NIH3T3-KDR およびコントロールの VEGF 未刺激細胞から細胞抽出液を調製し、抗 KDR/F1k-1 モノクローナル抗体を用いた イムノブロットを行った。

第 9 図に示すように、KDR/F1k-1 の 947~966 番目のアミノ酸配列からなるペプチドをウサギに免疫して得られたウサギポリクローナル抗体では VEGF 刺激、無刺激に関係なく 230kDa の KDR/F1k-1 のバンドが検出された。

一方、モノクローナル抗体 KM3035 では VEGF で刺激した場合にのみ、230kDa のリン酸化 KDR/F1k-1 のバンドが検出された。したがって、KM3035 は KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンの自己リン酸化を特異的に検出できることが確認された。



### 参考例 1 変異型 KDR/F1k-1 発現アデノウイルスベクターの作製

変異型の KDR/F1k-1 である Y1175F (1175 位のチロシンをフェニルアラニンに置換)、Y1214F (1214 位のチロシンをフェニルアラニンに置換)、Y801F (801 位のチロシンをフェニルアラニンに置換) を発現するアデノウイルスベクターを以下のように作製した。

Y1175F をコードする DNA は配列番号 3 で表される塩基配列を有するプライマーを用いて、天然型の KDR/F1k-1 cDNA [Sawano A et al., Cell Growth Differ., 7, 213 (1996)] を鋳型にして PCR を行うことにより変異を導入した断片を、KDR/F1k-1 cDNA の ApaI/PstI サイト間に挿入することにより作製した。Y1214F をコードする DNA は配列番号 4 で表される塩基配列のプライマーを用いて同様に PCR を行うことにより変異を導入した断片を、KDR/F1k-1 cDNA の ApaI/PstI サイト間に挿入することにより作製した。また、Y801F をコードする DNA は配列番号 5 で表される塩基配列を有するプライマーを用いて同様に PCR を行うことにより変異を導入した断片を、KDR/F1k-1 cDNA の SphI/BamHI サイト間に挿入することにより作製した。これらの変異型 KDR/F1k-1 をコードする DNA は、塩基配列を決定して変異が導入されていることを確認した。これらの変異型 KDR/F1k-1 をコードする DNA についてアデノウイルス発現ベクターキット (宝酒造社製) を用いることにより、それぞれの KDR/F1k-1 発現アデノウイルスベクター (組換えアデノウイルス) を作製した。

### 産業上の利用可能性

本発明により、KDR/F1k-1 の細胞内情報伝達を遮断し、VEGF による細胞増殖を阻害する物質が提供される。さらに、該物質を用いた KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害する方法、細胞増殖を阻害する方法、血管新生を阻害する方法、細胞増殖阻害剤のスクリーニング法、血管新生阻害剤のスクリーニング法、KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害する物質のスクリーニング法、被験物質が KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害するか否かを判定する方法、組織での血管新生を検出する方法、および

KDR/F1k-I の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法が提供される。

#### 配列フリーテキスト

配列番号 1－人工配列の説明：合成アミノ酸

配列番号 2－人工配列の説明：合成アミノ酸

配列番号 3－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 4－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 5－人工配列の説明：合成 DNA

## 請 求 の 範 囲

1. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害する方法。
2. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、細胞増殖を阻害する方法。
3. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、血管新生を阻害する方法。
4. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、細胞増殖阻害剤のスクリーニング法。
5. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、血管新生阻害剤のスクリーニング法。
6. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害する物質のスクリーニング法。
7. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、被験物質が KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害するか否かを判定する方法。
8. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、組織での血管新生を検出する方法。

9. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法。
10. 情報伝達分子がホスホリパーゼ C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) である、請求の範囲 1~9 のいずれかに記載の方法。
11. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質が、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 を特異的に認識する抗体である、請求の範囲 1~9 のいずれかに記載の方法。
12. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 を特異的に認識する抗体が、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に結合し、かつ PLC- $\gamma$  のリン酸化を阻害する抗体である、請求の範囲 11 記載の方法。
13. 抗体がモノクローナル抗体またはその抗体断片である、請求の範囲 11 または 12 記載の方法。
14. KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害する方法。
15. KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、細胞増殖を阻害する方法。
16. KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、血管新生を阻害する方法。

17. KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、被験物質が KDR/F1k-1 の情報伝達を阻害するか否かを判定する方法。
18. KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、組織での血管新生を検出する方法。
19. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を有効成分として含有する薬剤。
20. 薬剤が、チロシンリン酸化阻害剤である請求の範囲 19 に記載の薬剤。
21. 薬剤が、細胞増殖阻害剤である請求の範囲 19 に記載の薬剤。
22. 薬剤が、血管新生阻害剤である請求の範囲 19 に記載の薬剤。
23. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質が、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 を特異的に認識する抗体である、請求の範囲 19～22 のいずれかに記載の薬剤。
24. 抗体が、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 を特異的に認識する抗体が、1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に結合し、かつホスホリパーゼ C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) のリン酸化を阻害する抗体である、請求の範囲 23 に記載の薬剤。
25. 抗体がモノクローナル抗体またはその抗体断片である、請求の範囲 23 または 24 に記載の薬剤。

26. KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有する KDR/F1k-1 のチロシンリン酸化阻害剤。

27. KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有する細胞増殖阻害剤。

28. KDR/F1k-1 の 1175 位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有する血管新生阻害剤。

29. 請求の範囲 4～6 および 9 のいずれかに記載の方法により得られる化合物。

30. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 を認識するモノクローナル抗体またはその抗体断片。

31. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に結合し、かつリン酸化した KDR/F1k-1 に対する情報伝達分子の結合を阻害するモノクローナル抗体またはその抗体断片である、請求の範囲 30 記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片。

32. 1175 位チロシンがリン酸化した KDR/F1k-1 に結合し、かつホスホリパーゼ C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) のリン酸化を阻害するモノクローナル抗体またはその抗体断片である、請求の範囲 30 または 31 記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片。

33. ハイブリドーマ KM3035 (FERM BP-7729) が生産するモノクローナル抗体またはその抗体断片である、請求の範囲 30～32 記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片。

34. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、1 本鎖抗体 (scFv)、2 量体化可変領域 (V 領域) 断片 (Diabody)、ジスルフィド安定化 V 領域断片 (dsFv) および相補性決定領域 (CDR) を含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求の範囲 30～33 のいずれか 1 項に記載の抗体断片。

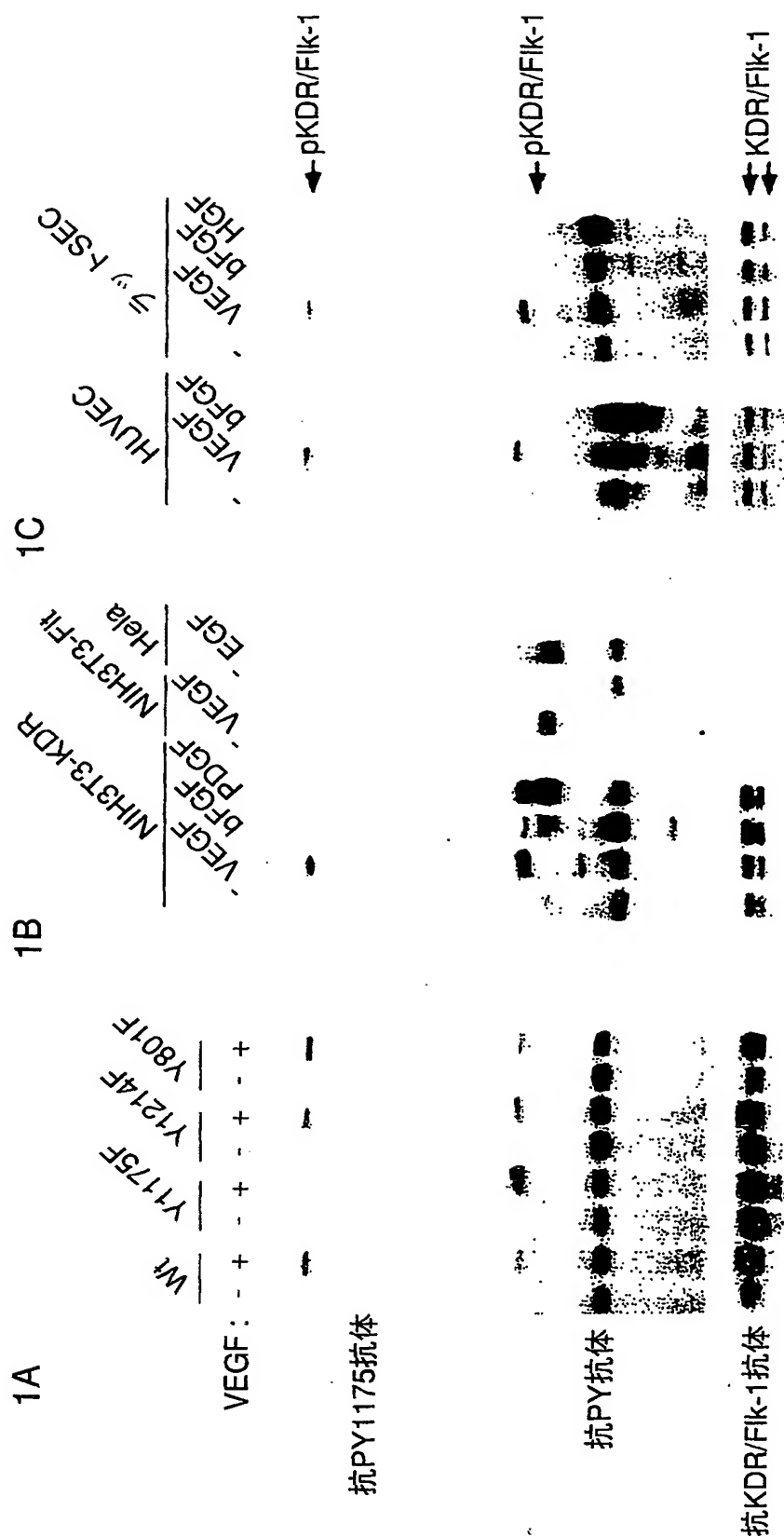
35. 請求の範囲 30～34 のいずれか 1 項に記載されたモノクローナル抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合しているモノクローナル抗体またはその抗体断片。

36. 請求の範囲 30～35 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片をコードする DNA。

37. 請求の範囲 36 記載の DNA を含む組換えベクター。

38. 請求の範囲 37 記載の組換えベクターが宿主細胞に導入された形質転換体。

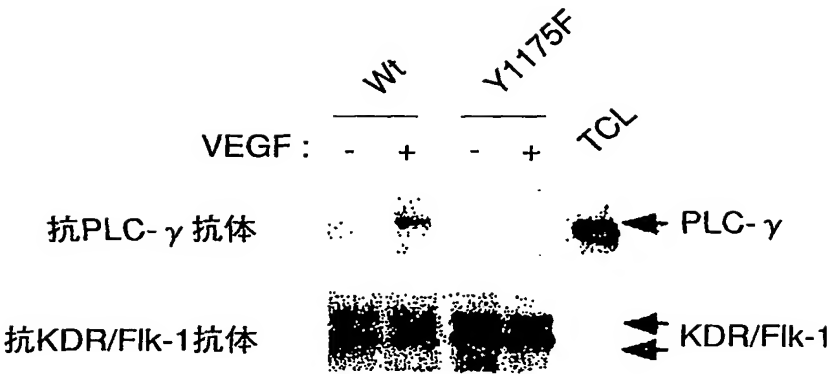
# 第1図



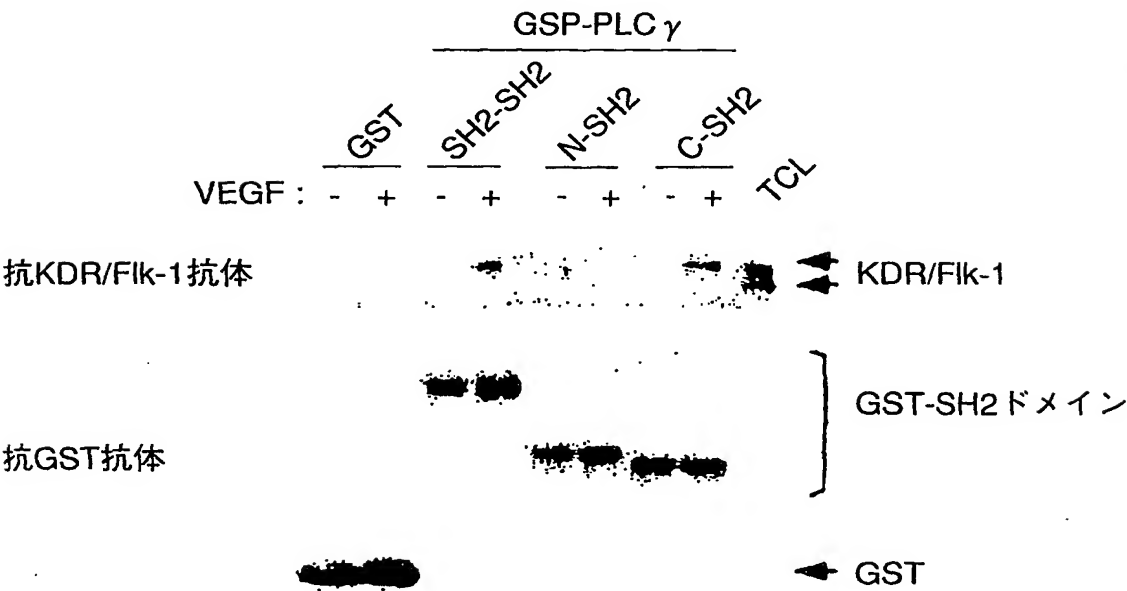
BEST AVAILABLE COPY



第 2 図

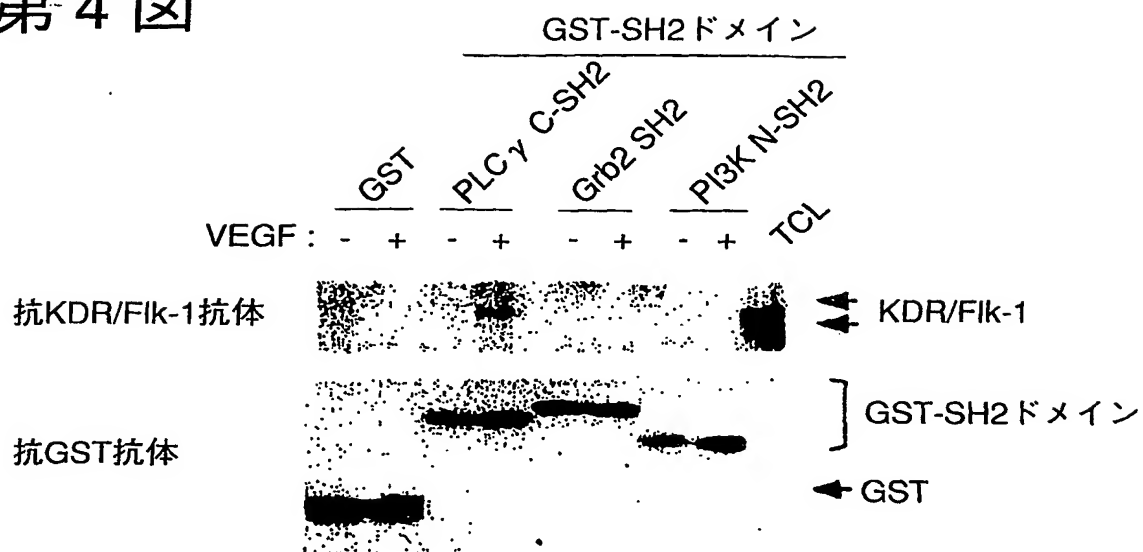


第 3 図

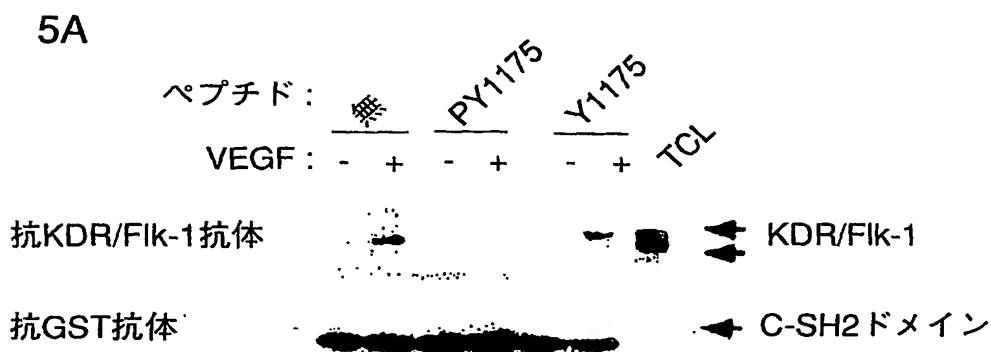
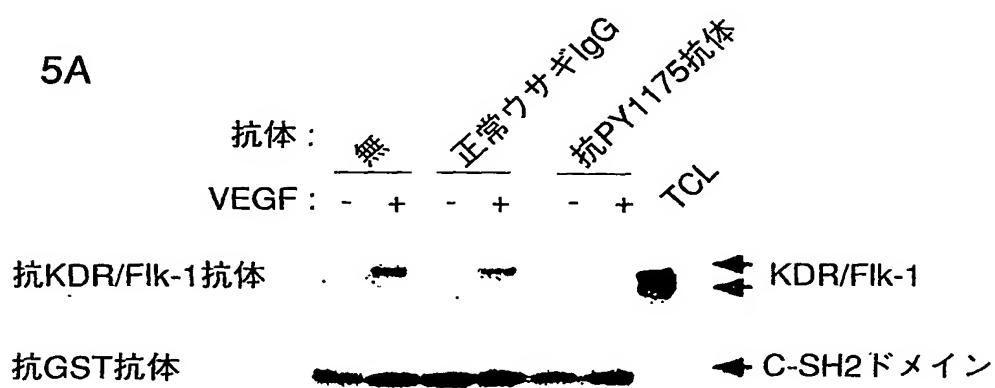


BEST AVAILABLE COPY

## 第4図

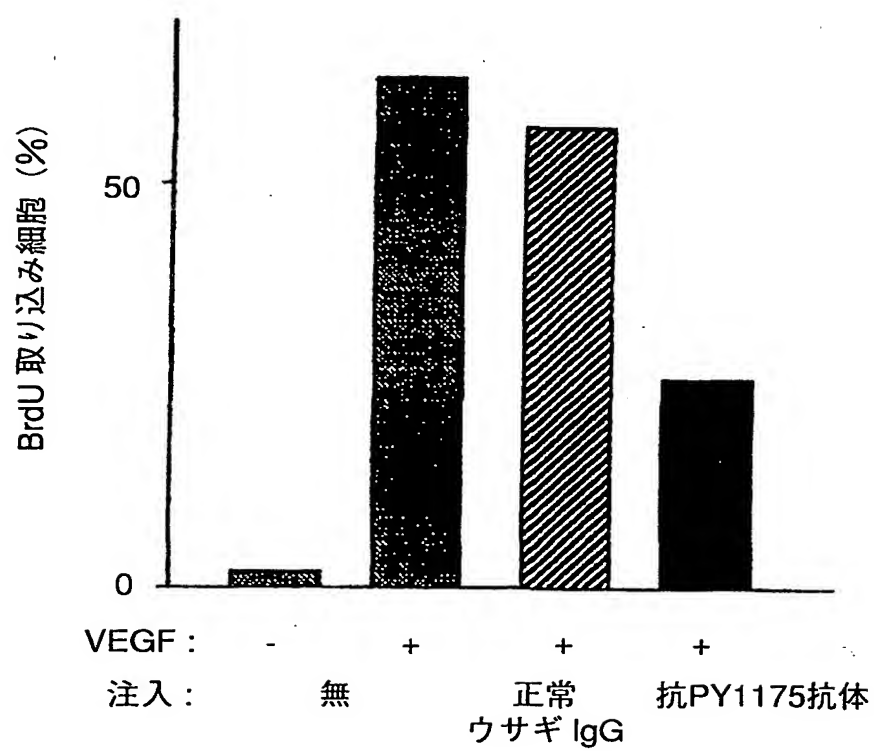


## 第5図



BEST AVAILABLE COPY

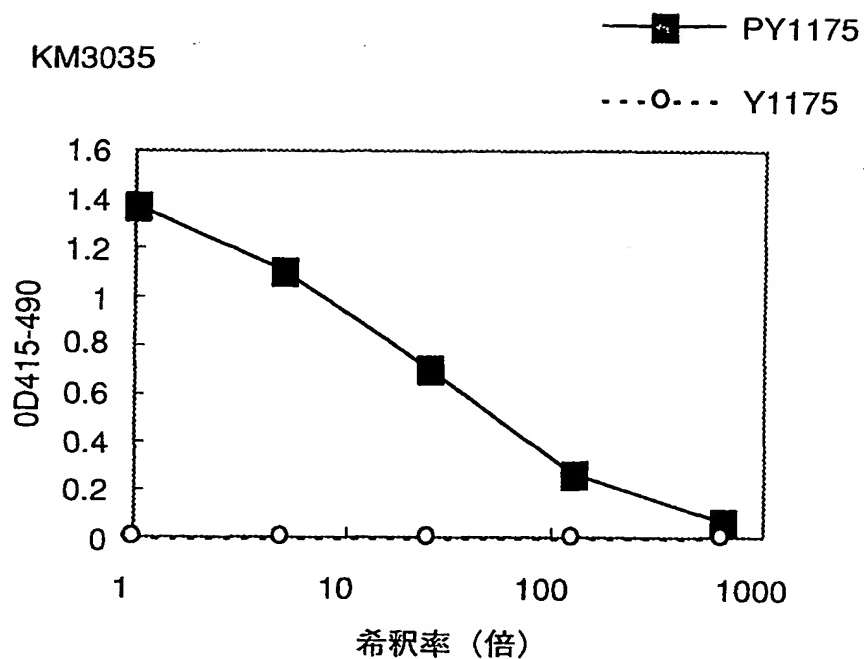
## 第 6 図



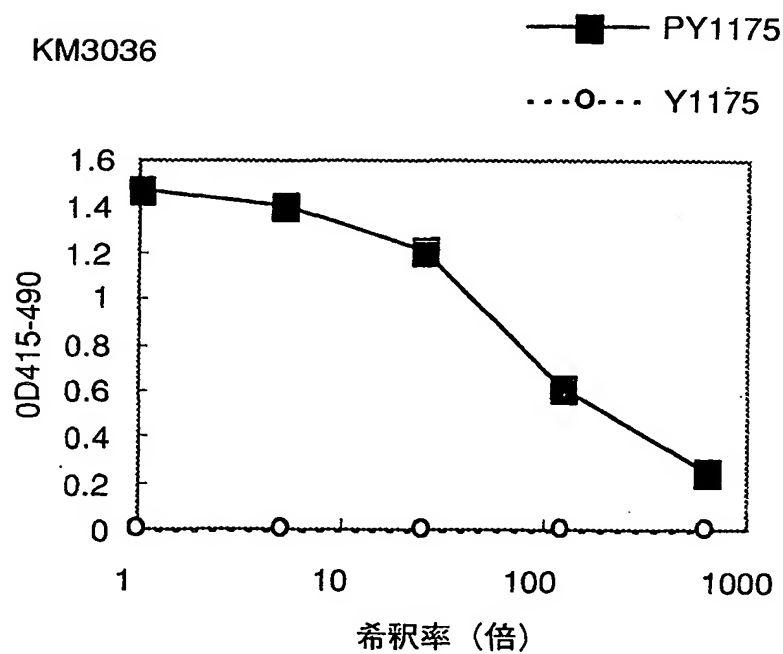
BEST AVAILABLE COPY

## 第7図

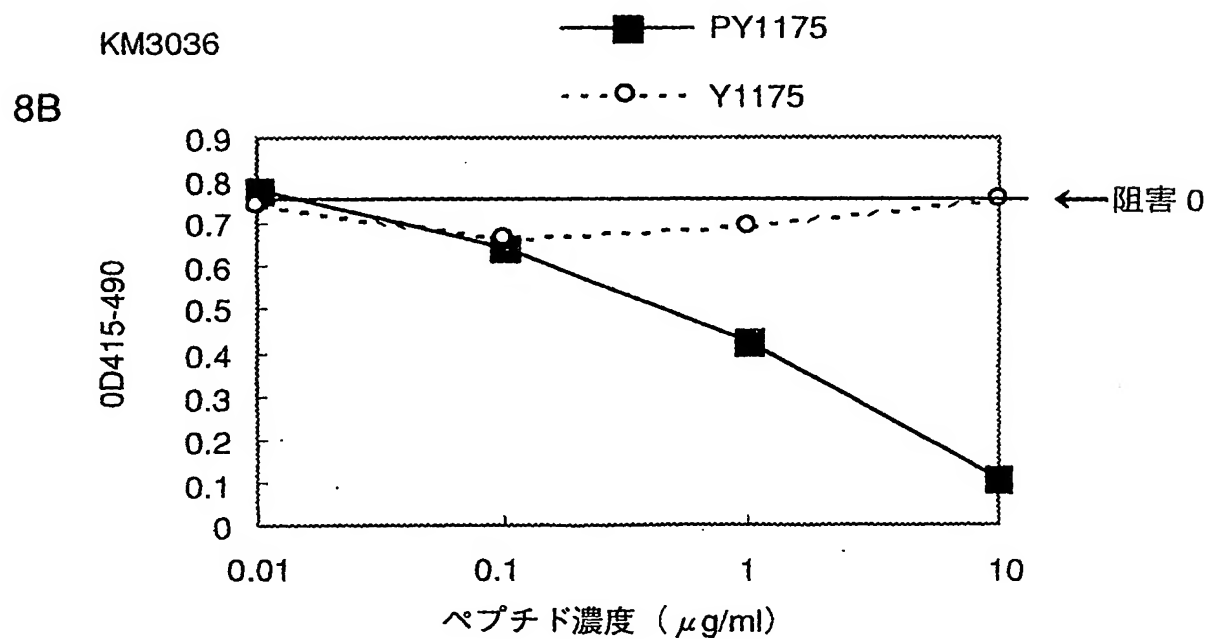
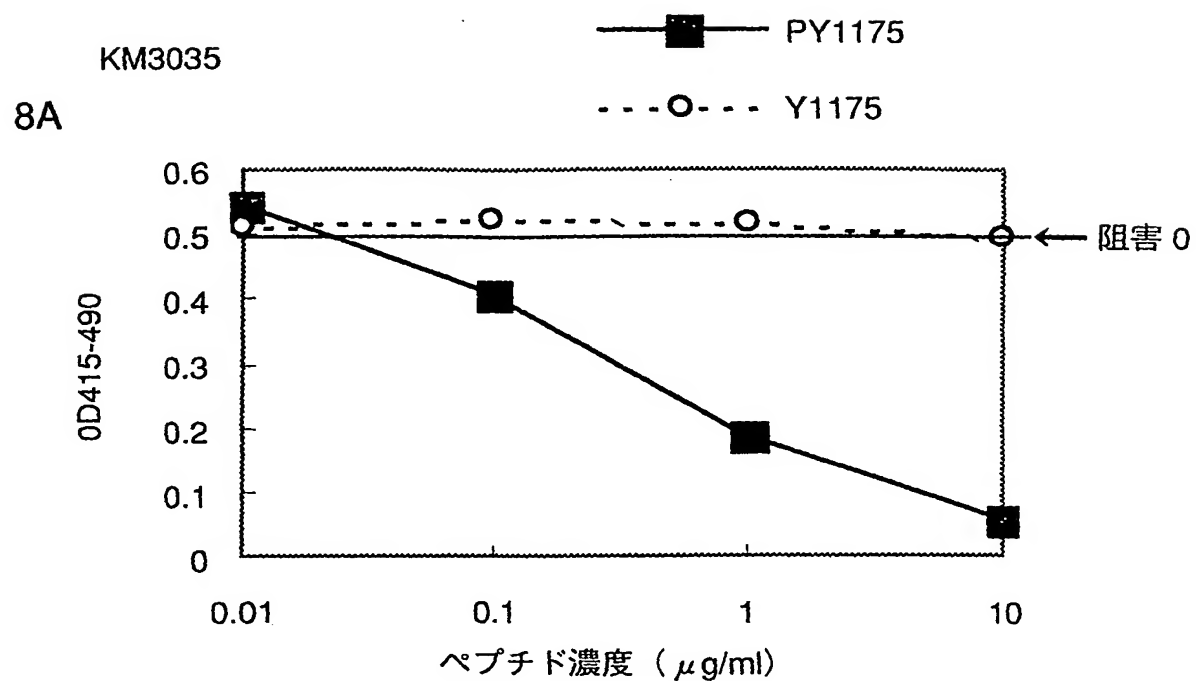
7A KM3035



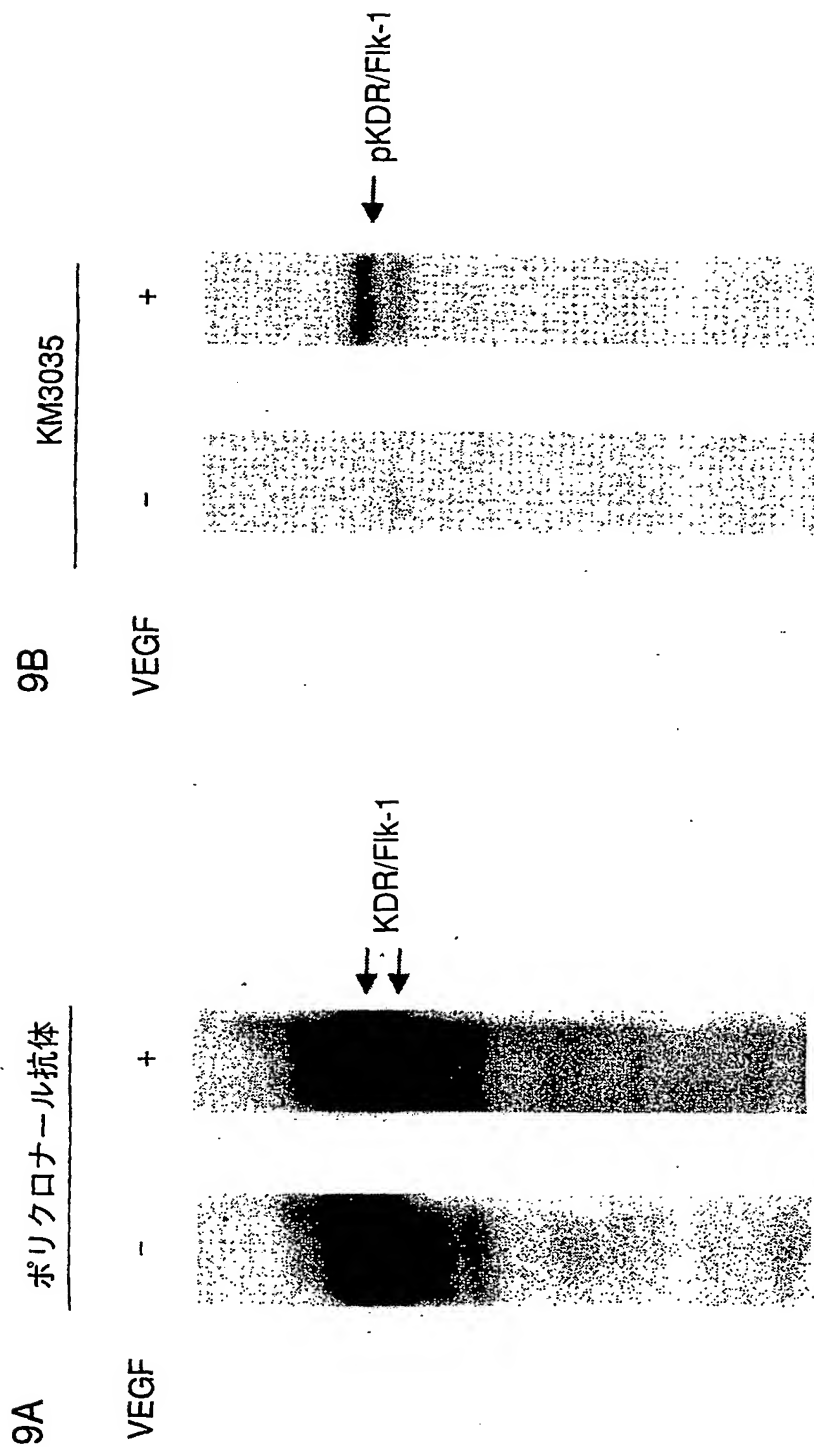
7B KM3036



## 第 8 図



# 第9図



## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<110> SHIBUYA Masabumi

<120> Substance which inhibits binding of information transfer molecule for 1175-tyrosine phosphorylated KDR/Flk-1 and usages of the same

<130> P-38125

<150> JP 2000-303694

<151> 2000-10-03

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Phosphorylation

<222> 6

<220>

<223> an antigen peptide for human KDR/Flk-1 phosphorylated at 1175-tyrosine corresponding to its residue 1171-1180 and added cysteine residue at the N-terminal

<400> 1

Cys Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a peptide consisting of the same sequence as SEQ ID NO:1 without phosphorylation

<400> 2

Cys Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a primer for replacing of human KDR/Flk-1 tyrosine residue at position 1175 to phenylalanine.

<400> 3

gatggcaaag acttcattgt tcttccc

27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a primer for replacing of human KDR/Flk-1 tyrosine residue at position 1214 to phenylalanine.

<400> 4

cccaaattcc atttcgacaa cacagca

27

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a primer for replacing of human KDR/Flk-1 tyrosine residue at position 801 to phenylalanine.



&lt;400&gt; 5

gacaggcttc- ttgtccatcg

20

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 6

Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys Arg Arg  
 1 5 10 15

Leu Asp Ser Ile  
 20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1356

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 7

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu  
 1 5 10 15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro  
 20 25 30

Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr  
 35 40 45

Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro  
 50 55 60

Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser  
 65 70 75 80

Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn  
 85 90 95

Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser  
 100 105 110  
 Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser  
 115 120 125  
 Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys  
 130 135 140  
 Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg  
 165 170 175  
 Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile  
 180 185 190  
 Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser  
 195 200 205  
 Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr  
 210 215 220  
 Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu  
 225 230 235 240  
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile  
 245 250 255  
 Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu  
 260 265 270  
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe  
 275 280 285  
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Ile Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu  
 290 295 300  
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr  
 305 310 315 320

Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Pro	Phe	Val	Ala	Phe	Gly	Ser	Gly	Met
325								330				335			
Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Ala
340								345				350			
Lys	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Pro	Pro	Glu	Ile	Lys	Trp	Tyr	Lys	Asn	Gly
355								360				365			
Ile	Pro	Leu	Glu	Ser	Asn	His	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	His	Val	Leu	Thr
370								375				380			
Ile	Met	Glu	Val	Ser	Glu	Arg	Asp	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr	Val	Ile	Leu
385								390				395			
Thr	Asn	Pro	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	Gln	Ser	His	Val	Val	Ser	Leu	Val
				405								410			
Val	Tyr	Val	Pro	Pro	Gln	Ile	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Val
				420								425			
Asp	Ser	Tyr	Gln	Tyr	Gly	Thr	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Tyr
435								440				445			
Ala	Ile	Pro	Pro	Pro	His	His	Ile	His	Trp	Tyr	Trp	Gln	Leu	Glu	Glu
450								455				460			
Glu	Cys	Ala	Asn	Glu	Pro	Ser	Gln	Ala	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Pro	Tyr
465								470				475			
Pro	Cys	Glu	Glu	Trp	Arg	Ser	Val	Glu	Asp	Phe	Gln	Gly	Gly	Asn	Lys
				485								490			
Ile	Glu	Val	Asn	Lys	Asn	Gln	Phe	Ala	Leu	Ile	Glu	Gly	Lys	Asn	Lys
				500								505			
Thr	Val	Ser	Thr	Leu	Val	Ile	Gln	Ala	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Leu	Tyr
515								520				525			
Lys	Cys	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Val	Gly	Arg	Gly	Glu	Arg	Val	Ile	Ser

530	535	540
Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln		
545	550	555 560
Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser		
565	570	575
Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro		
580	585	590
Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr		
595	600	605
Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile		
610	615	620
Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr		
625	630	635 640
Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val		
645	650	655
Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn		
660	665	670
Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys		
675	680	685
Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn		
690	695	700
Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg		
705	710	715 720
Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr		
725	730	735
Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe		
740	745	750

Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu  
 755 760 765

Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile  
 770 775 780

Ile Leu Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Gly Gly Glu Leu Lys Thr Gly  
 785 790 795 800

Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu His  
 805 810 815

Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp  
 820 825 830

Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val  
 835 840 845

Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Arg Thr  
 850 855 860

Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg  
 865 870 875 880

Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu  
 885 890 895

Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu  
 900 905 910

Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu  
 915 920 925

Arg Ser Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Thr Lys Gly Ala Arg  
 930 935 940

Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys  
 945 950 955 960

Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly  
 965 970 975

Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro  
 980 985 990

Glu Asp Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr  
 995 1000 1005

Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys  
 1010 1015 1020

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Lys Asn  
 1025 1030 1035 1040

Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp  
 1045 1050 1055

Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met  
 1060 1065 1070

Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr Ile Gln Ser Asp Val  
 1075 1080 1085

Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser  
 1090 1095 1100

Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys  
 1105 1110 1115 1120

Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr  
 1125 1130 1135

Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr  
 1140 1145 1150

Phe Ser Glu Leu Val Glu His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala  
 1155 1160 1165

Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu  
 1170 1175 1180

Ser Met Glu Glu Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser

1185	1190	1195	1200
Cys Met Glu Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn			
1205	1210	1215	
Thr Ala Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg			
1220	1225	1230	
Pro Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu			
1235	1240	1245	
Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu			
1250	1255	1260	
Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu Ser Pro			
1265	1270	1275	1280
Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser Val Ala Ser			
1285	1290	1295	
Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly Tyr His Ser Asp			
1300	1305	1310	
Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu Ala Glu Leu Leu Lys			
1315	1320	1325	
Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser Thr Ala Gln Ile Leu Gln			
1330	1335	1340	
Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser Pro Pro Val			
1345	1350	1355	